(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116964084 A
(43)申请公布日 2023.10.27

(21)申请号 202280012964.0
(22)申请日 2022.01.27
(66)本国优先权数据
202110178932.5 2021.02.07 CN
202110937430.6 2021.08.16 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.08.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2022/074133 2022.01.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/166728 ZH 2022.08.11
(71)申请人 正大天晴药业集团股份有限公司
地址 222062 江苏省连云港市郁州南路369号
(72)发明人 王亮亮 张正平 孙聪聪 赵荣娟 李奕萌
(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)

(54)发明名称

双特异性抗体

(57)摘要

提供一种双特异性抗体，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，其中第一抗原结合部分的配对结构域包含工程化的HLA-Iα3的氨基酸序列和工程化的β2M的氨基酸序列。还提供双特异性抗体的表达方法，编码所述双特异性抗体的多核苷酸、含有所述多核苷酸的载体和宿主细胞、包含所述双特异性抗体的药物组合物，以及融合蛋白和缀合物。提供的双特异性抗体，防止或减弱不同特异性的重链和轻链的错配。

CN 116964084 A

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 8 月 11 日 (11.08.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/166728 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 14/74* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/074133

(22) 国际申请日: 2022 年 1 月 27 日 (27.01.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110178932.5 2021年2月7日 (07.02.2021) CN
202110937430.6 2021年8月16日 (16.08.2021) CN

(71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (**CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。

(72) 发明人: **王亮亮 (WANG, Liangliang)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。 **张正平 (ZHANG, Zhengping)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。 **孙聪聪 (SUN, Congcong)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。 **赵荣娟 (ZHAO, Rongjuan)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。 **李奕萌 (LI, Yimeng)**; 中国江苏省南京市江宁区福英路1099号（江宁高新园）, Jiangsu 211100 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(54) **Title:** BISPECIFIC ANTIBODY

(54) **发明名称:** 双特异性抗体

(57) **Abstract:** Provided is a bispecific antibody, comprising a first antigen-binding moiety and a second antigen-binding moiety, wherein a paired domain of the first antigen-binding moiety comprises an amino acid sequence of engineered HLA-Iα3 and an amino acid sequence of engineered β2M. Also provided are an expression method for the bispecific antibody, a polynucleotide encoding the bispecific antibody, a vector and host cell containing the polynucleotide, a pharmaceutical composition containing the bispecific antibody, a fusion protein, and a conjugate. The bispecific antibody provided can prevent or attenuate mismatches between heavy and light chains of different specificities.

(57) **摘要:** 提供一种双特异性抗体，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，其中第一抗原结合部分的配对结构域包含工程化的HLA-Iα3的氨基酸序列和工程化的β2M的氨基酸序列。还提供双特异性抗体的表达方法，编码所述双特异性抗体的多核苷酸、含有所述多核苷酸的载体和宿主细胞、包含所述双特异性抗体的药物组合物，以及融合蛋白和缀合物。提供的双特异性抗体，防止或减弱不同特异性的重链和轻链的错配。

WO 2022/166728 A1

双特异性抗体

技术领域

本发明涉及抗体，尤其涉及改善抗体轻重链错配的双特异性抗体。

背景技术

20 世纪 60 年代初，Nisonoff 和同事首次描述了具有两种不同抗原结合位点的人工抗体分子-双特异性抗体(BsAb, bispecific antibody)的概念（Nisonoff 等, Science 132, 1770–1771(1960)）。他们用轻微的再氧化来偶联具有不同特异性的兔抗原结合片段(Fab)，显示这两种抗原结合片段介导的两种不同类型的细胞的凝集作用（Fudenberg 等, A. J.Exp. Med. 119, 151–166 (1964)）。一系列概念和技术创新之后，随着抗体工程和抗体生物学的重大进展而发展，双特异性抗体概念正在被生物技术和制药公司商业化，以产生新颖和独特的治疗方法。

在双特异抗体研发设计时，需要以临床治疗目的为基础，保证两对不同特异性的轻链和重链正确配对，还需要保持每个单克隆抗体各自结合域的独立性，保证结合不同表位时不会产生空间位阻的干扰，同时还要求抗体分子易于用哺乳动物细胞进行表达，不需要复杂的蛋白修饰工艺。其中不对称性分子设计形式的双特异性抗体力求尽可能地保留天然抗体的天然结构，以保持相关的功能特征和有利的质量属性。通过打破抗体 H2L2 组件的对称性，以解决链错配的问题。

双特异性抗体凭借其双靶向性的优势成为目前肿瘤治疗新兴药物研究领域之一，双特异性抗体的构建和制备技术也经历了一系列的革新，目的之一是为了解决错配问题，提高生产效率。一些双特异性抗体需要通过共表达两条不同的重链和两条不同的轻链，并且还要从多种重组产物中挑选目标性的双特异性抗体，这也一直是双抗开发过程中难题之一。为了解决链的错配，近些年科学家已经研发了许多策略和技术平台，可设计和表达不同结构的双抗。目前双抗的结构已有数十种之多，出自不同的制备平台，较为成熟的为 Genentech/Roche knob-into-hole、Amgen BiTe、Chugai/Roche ART-Ig 平台，其中 Knob-into-hole 是解决重链错配问题的经典技术，还有其他技术平台例如 DVD-Ig、TrioMab、DART、FIT-Ig、WuXiBody 等。

大多数不对称形式的双特异性抗体通过向 Fc 区中引入突变(Ridgway 等, Protein Engineering, Design and Selection, 9(7), 617-621.)，强制矫正并促使重链之间配对，实现了两个不同的重链的异源二聚组装。然后，通过差异化 Protein A 结合设计纯化策略，结合顺序亲和色谱，分子量差异的色谱纯化策略，来分离所需的最终产物。避免轻重链错配策略，通常分开表达双特异性分子作为半分子，或亲本抗体，然后再将抗体半分子进行组装，可以通过设计重链突变来实现重链的异源二聚体。然而，单个抗体各自的轻重链的选择性配对仍然具有挑战性。

发明内容

本发明提供了改进结构设计的双特异性抗体，防止或减弱不同特异性的重链和轻链的错配。

一方面，本发明提供了双特异性抗体，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分特异性结合两种不同抗原或同一种抗原的不同表位，其中所述第一抗原结合部分包含：

第一多肽，所述第一多肽自 N 端至 C 端包含第一重链可变结构域以及与所述第一重链可变结构域可操作连接的第一配对结构域，和

第二多肽，所述第二多肽自 N 端至 C 端包含第一轻链可变结构域以及与所述第一轻链可变结构域可操作连接的第二配对结构域，

其中，所述第一配对结构域和第二配对结构域中的一个配对结构域包含工程化的 HLA-I

α3 的氨基酸序列，另一个配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述第一配对结构域和第二配对结构域能够形成二聚体，所述第一配对结构域和第二配对结构域之间能够形成至少一个非天然链间键且所述非天然链间键能够稳定所述二聚体。

在一些实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列与 SEQ ID NO：1 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，所述工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO：2 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性。

在一些具体的实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述第二抗原结合部分包含第二重链可变结构域和第二轻链可变结构域。

在一些实施方案中，所述第二抗原结合部分包含 Fab。所述 Fab 包含所述的第二重链可变结构域和第二轻链可变结构域。

在一些实施方案中，提供了双特异性抗体，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分特异性结合两种不同抗原或同一种抗原的不同表位，其中所述第一抗原结合部分包含：

第一多肽，所述第一多肽自 N 端至 C 端包含第一重链可变结构域以及与所述第一重链可变结构域可操作连接的第一配对结构域，和

第二多肽，所述第二多肽自 N 端至 C 端包含第一轻链可变结构域以及与所述第一轻链可变结构域可操作连接的第二配对结构域，

其中，所述第一配对结构域和第二配对结构域中的一个配对结构域包含工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列，另一个配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列；所述工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列、工程化的 β2 微球蛋白分别与 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性；所述第二抗原结合部分包含 Fab。在一些这种实施方案中，根据 EU 编号，所述 Fab 的 CL 结构域在 F118 位置的氨基酸被丙氨酸取代。在一些实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：4 或 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，提供了双特异性抗体，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分特异性结合两种不同抗原或同一种抗原的不同表位，其中所述第一抗原结合部分包含：

第一多肽，所述第一多肽自 N 端至 C 端包含第一重链可变结构域以及与所述第一重链可变结构域可操作连接的第一配对结构域，和

第二多肽，所述第二多肽自 N 端至 C 端包含第一轻链可变结构域以及与所述第一轻链可变结构域可操作连接的第二配对结构域，

其中，所述第一配对结构域和第二配对结构域中的一个配对结构域包含工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列，另一个配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列；所述第二抗原结合部分包含 Fab，根据 EU 编号，所述 Fab 的 CL 结构域在 F118 位置的氨基酸被丙氨酸取代。在一些这种实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列、工程化的 β2 微球蛋白分别与 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性。进一步的，在一些实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：4 或 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列。

在一些上述实施方案中，所述第一配对结构域包含工程化的 HLA-Iα3 的氨基酸序列，所述第二配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列。

在一些上述实施方案中，所述第一配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列，所述第二配对结构域包含工程化的 HLA-Iα3 的氨基酸序列。

在一些上述实施方案中，所述双特异性抗体包含 Fc。

一方面，本发明提供了分离的多核苷酸，其编码本发明所述的双特异性抗体。

一方面，本发明提供了分离的载体，其包含本发明所述的多核苷酸。

一方面，本发明提供了宿主细胞，其包含本发明所述的分离的多核苷酸，或分离的载体。

另一方面，本发明提供了表达所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括在所述双特异性抗体被表达的条件下培养所述的宿主细胞。

另一方面，本发明提供了药物组合物，其包含本发明所述的双特异性抗体以及药学上可接受的载体。

另一方面，本发明提供了缀合物，其包含本发明所述的双特异性抗体以及与所述双特异性抗体连接或缀合的治疗剂。

另一方面，本发明提供了融合蛋白，其包含融合表达的融合组分以及所述的双特异性抗体。

又一方面，本发明提供了在有需要的受试者中治疗疾病的方法，包括向受试者施用治疗有效量的本发明所述的双特异性抗体、药物组合物、缀合物或融合蛋白。

本发明双特异性抗体中，第一抗原结合部分中的配对结构域利用工程化的 HLA-I α3 和工程化的 β2 微球蛋白可以改善链的错配，如相比于第一和第二抗原结合部分均为天然 Fab 的对应部分的情况，所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分更不容易发生错配，从而提高目标抗体的产率、纯度。

特别的，设计的双特异性抗体对抗原保持良好的亲和力或/和热稳定性。某些方面，设计的双特异性抗体降低了免疫原性风险。

附图说明

图 1 为 HLA-I-B 分子α链恒定区的一致性序列；

图 2 为基于 MHC-I 元件构建的抗 CD3/CD38 双特异性抗体结构示意图；

图 3 为 MHI383-ccff-IgG1 分子结构示意图；

图 4 为 MHI383-ccff-IgG1 分子 SEC 纯化图谱；

图 5 为 MHI383-ccff-IgG1 完整分子量质谱图谱；

图 6 为含 MHCICα，MHCICβ, CH1, CL 结构域的重轻链彼此配对组合表达的非还原 SDS-PAGE；

图 7 为 HZ5G11VL-IgK 或其引入氨基酸突变后与 HZ14A9VH-Cα-IgG1 的组合表达产物的非还原 SDS-PAGE；

图 8 为基于 MHC-I 元件构建的 MHL147-3322-IgG1-wt 双特异性抗体结构示意图；

图 9 为基于 MHC-I 元件构建的 MHL147-3322-IgG1-F118A 双特异性抗体结构示意图；

图 10 为不同浓度的双特异性抗体 MHL147-3322-IgG1-wt 和 MHL147-3322-IgG1-F118A 对红细胞凝集的影响；

图 11 为抗体 HZ5G11 与 HZ14A9 在 CL 引入 F118A 后的非还原 SDS-PAGE；

图 12 为本发明双特异性抗体的一些示例性结构形式图，其中，（A）分别与 Fc 多肽 N 端连接的不同特异性的 MHC 修饰的抗原结合部分（第一抗原结合部分）与 Fab 的“1+1”形式，（B）分别与 Fc 多肽连接的不同特异性的 MHC 修饰的抗原结合部分（第一抗原结合部分，Cα 与 Cβ 取向与（A）不同）与 Fab 的“1+1”形式，（C）“2+1”形式，第一抗原结合部分与一个 Fab 分别与 Fc 多肽连接，另一个 Fab 与第一抗原结合部分的 N 端连接，（D）“2+1”形式，与（C）不同，两个 Fab 串连，（E）“2+1”形式，两个 Fab 分别与 Fc 多肽连接，第一抗原结合部分与一个 Fab 的 N 端连接，（F）“2+1”形式，与（E）不同，第一抗原结合部分与 Fc 多肽的 C 端连接，（G）“2+2”形式，抗原结合部分与 Fc 的 N 端连接，（H）“2+2”形式，第一抗原结合部分均与 Fc 的 C 端连接；Fc 域还可以携带氨基酸取代，例如 KIH 等，CL 可以携带 F118A，该图例中未显示氨基酸取代。

术语

术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用，指的是包含抗原结合位点的蛋白，涵盖各

种结构的天然抗体和人工抗体，包括但不限于单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体、三特异性抗体等)、单链抗体等。

术语“多特异性”意指抗体能够特异性结合至少两种不同的抗原决定簇。通常，双特异性抗体包含两种抗原结合位点，其中每种特异于不同的抗原性决定簇。不同的抗原决定簇可以在相同或不同的细胞上表达。不同的抗原决定簇可以因抗原种类不同而不同（例如结合抗原 PDL1 和 CD47），也可以存在同一种抗原上。抗原决定簇是抗原物质分子表面或其他部位，具有一定组成和结构的特殊化学基团，能与其相应抗体或致敏淋巴细胞发生特异性结合的结构。抗原决定簇一个例子是，抗原决定簇 CD47 作为一种抗原物质，其具有多种结构已确定或结构未确定的抗原决定簇。一个具体的双特异性抗体例如可以结合 PDL1 和 CD47。

术语“特异性结合”意为结合对于抗原而言是选择性的并且可以与不需要或非特异性的相互作用区别开。

术语“...价”抗体指抗体中存在的抗原结合位点的数目。“二价”抗体指抗体存在两个抗原结合位点，“三价”指抗体存在三个抗原结合位点。天然的人免疫球蛋白分子通常具有两个抗原结合位点，Fab 通常具有单个抗原结合位点。单可变结构域、ScFv 通常具有单个抗原结合位点。

术语“抗原结合部分”指特异性结合抗原决定簇的多肽分子。具体的抗原结合部分可以是 Fab、ScFv 或单可变结构域等。本文中的抗原决定簇与抗原表位同义。

本发明中关于抗原结合部分、抗原、重链可变结构域、轻链可变结构域、Fc 多肽等所用的术语“第一”、“第二”或“第三”是为了在存在一个以上各类型的部分时方便区分而使用。除非明确说明，这些术语的使用并非旨在赋予双特异性抗体的具体顺序或取向。

术语“可操作连接”或“可操作性的连接”是指两个或更多个目标生物学序列的以使其处于使其以目的方式作用的关系的方式并列，无论是否存在间隔子或接头。当用于多肽时，该术语旨在表示多肽序列以使所连接的产物具有目的生物学功能的方式连接。例如，可将抗体可变区可操作地连接至恒定区，以形成具有抗原结合活性的稳定产物。所述术语还可用于多核苷酸。举例来说，当编码多肽的多核苷酸可操作地连接至调控序列(例如启动子、增强子、沉默子序列等)时，该术语旨在表示所述多核苷酸序列以允许所述多肽受所述多核苷酸的调控表达的方式连接。

主要组织相容性复合体（major histocompatibility complex，MHC）是一组编码动物主要组织相容性抗原的基因群的统称。小鼠的 MHC 称为 H-2 基因复合体，人类的 MHC 被称为 HLA（human leukocyte antigen，HLA）基因复合体，其编码产物称为 HLA 分子、HLA 抗原或人白细胞抗原。HLA 基因复合体位于人类 6 号染色体的短臂 6p21.3 处，同时含有 220 多个不同功能的基因。这些基因多数会编码免疫系统中的蛋白质。MHC-I 类分子表达于几乎所有有核细胞表面，被 CD8+T 细胞识别。MHC-II 类分子表达于抗原递呈细胞表面，被 CD4+T 细胞识别。MHC 具有多态性，大部分人群主要包括 6 种经典的 MHC 分子：3 种经典的 MHC-I 类分子（HLA-A、HLA-B、HLA-C）和 3 种经典的 MHC-II 类分子（HLA-DR、HLA-DP、HLA-DQ）。人的 MHC-I 类分子（HLA-1）由重链（α 链）和 β_2 微球蛋白（β_2m，或者 β 链）组成，其中 α 链胞外段有三个结构域（α1、α2、和 α3），远膜端的 2 个结构域 α1 和 α2 构成抗原结合槽，结构域 α3 与人免疫球蛋白恒定区同源。

术语“可变结构域”或“可变区”是指抗体的涉及该抗体与抗原结合的结构域。例如天然四链抗体(例如来源于人、鼠等)具有重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，来源于骆驼科或鲨鱼等动物的仅重链抗体具有单可变结构域。天然抗体的每个可变结构域基本上由四个“框架区”和三个“互补决定区”组成。四个框架区分别称为框架区 1(或 FR1)、框架区 2(或 FR2)、框架区 3(或 FR3)、及框架区 4(或 FR4)；所述框架区由本领域及下文中分别称为互补决定区 1(或 CDR1)、互补决定区 2(或 CDR2)、及互补决定区 3(或 CDR3)的三个互补决定区(或 CDR)间隔开。因此，可变结构域的一般结构可如下表示为：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。可变结构域因具有抗原结合位点而赋予抗体对抗原的特异性。

“CDR”(互补决定区)，也称为“高变区(HVR)”。天然四链抗体通常包含六个 CDR，三个在重链可变区中(HCDR1、HCDR2和HCDR3)，三个在轻链可变区中(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。仅重链抗体或单可变结构域通常具有三个CDR(CDR1、CDR2和CDR3)。

当前有许多方法来划分定义CDR。其中，Kabat定义基于序列可变性划分CDR，并且是最常用的(Elvin A.Kabat, et al， Sequences of Proteins of Immunological Interest , 第5版, Public

Health Service , National Institutes of Health , Bethesda , Md .(1991))；而Chothia定义则基于结构环的位置(Cyrus Chothia, et al, Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins, J .Mol .Biol .196:901-917(1987))。AbM 定义是Kabat定义和Chothia定义之间的折衷方案，并且被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。“接触(contact)”定义CDR的基础是对可用的复合物晶体结构的分析。然而，应当注意的是，基于不同的方法定义获得的同一抗体可变区的CDR的边界可能有所差异，即不同方法定义的同一抗体可变区的CDR序列可能有所不同。因此，在涉及用本发明定义的具体CDR序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了转换为其他任意定义(例如Chothia、AbM定义等)的CDR序列限定的抗体。

术语“框架区”或“FR”是除了本文定义的CDR残基之外的那些可变结构域的氨基酸残基。

术语“Fab”指由免疫球蛋白的重链的 VH 和 CH1 以及轻链的 VL 和 CL 域组成的蛋白。本文中 Fab 意指处于它的天然型式的或经修饰的 Fab，其包含由重链可变区和恒定区 CH1 构成的 Fab 重链(VH-CH1，N 至 C 端方向)，和由轻链可变区和恒定区 CL 构成的 Fab 轻链(VL-CL，N 至 C 端方向)；经修饰的 Fab 例如可以是在 CH1/CL 结构域或/和 VH/VL 结构域引入氨基酸取代的 Fab，一个具体的实例，经修饰的 Fab 可以是在 CL 结构域引入氨基酸取代的 Fab。

术语“Fc 结构域”、“Fc”或“Fc 域”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的 C 端区域，其包含至少部分恒定区。该术语包括天然序列 Fc 和变体 Fc。Fc 的 C 末端赖氨酸(Lys447)可存在或不存在。除非另有说明，Fc 中氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统，也称为 EU 索引，描述于 Kabat，E.A 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991) ,NIH Publication 91-3242。第一配对结构域和第二配对结构域涉及氨基酸位置的描述时，是指按照相应序列的起始氨基酸为第一位进行顺序编号，例如 SEQ ID NO：1 中的 R60C 取代是指以 SEQ ID NO：1 中第一个氨基酸为位置 1 开始进行顺序编号，该序列中的第 60 位 R 取代为 C。本文所用的 Fc 域的其中一个“Fc 多肽”指形成二聚体 Fc 结构域的两条多肽之一。例如，IgG Fc 域的 Fc 多肽包含 IgG CH2 和 IgG CH3 恒定区。

术语“KD”在用于本文时指平衡解离常数，以摩尔浓度(M)表示。抗体的 KD 值可以使用本领域公知的方法测定。一种测定抗体 KD 的方法是使用表面等离子共振(surface plasmon resonance)，如使用生物传感器系统，例如 Biacore 系统。一种测定抗体 KD 的方法是使用生物膜层光学干涉（BLI, Bio-Layer Interferometry），例如 ForteBio 系统。

术语“治疗”指试图改变治疗个体中疾病的自然进程，并且可以是为了预防或在临床病理学的过程期间实施的临床干预。治疗的期望效果包括但不限于预防疾病的发生或复发，缓解症状，降低疾病的任何直接或间接病理学后果，预防转移，减缓疾病进展率，改善或减轻疾病状态，及消退或改善的预后。

术语“受试者”包括任何人类或非人动物。术语“非人动物”包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类、绵羊、犬、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。优选地，根据本发明的受试者是人。除非标明，术语“患者”或“受试者”可以互换使用。

术语“分离的”是指已经从其天然环境中分离的目标化合物(例如，VHH、多特异性抗体、抗体或核酸)。

氨基酸序列的“同一性百分数(%)"是指将待比对序列与本文中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后，并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时，待比对序列中与本文中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。同一性的氨基酸序列比对可以采用本领域范围内的多种方式进行，例如BLAST，BLAST-2，ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可决定用于比对序列的适宜参数，包括在比较序列的全长里获得最大比对需要的任何算法。

本发明上下文中，氨基酸取代表示为：原氨基酸-位置-取代的氨基酸，使用三字母码或单字母码，包括编码Xaa和X来表示氨基酸残基。因此，例如“H435R”意为将位置435处的氨基酸H取代为氨基酸R；对于取代的氨基酸可以包含多于1个，例如T366Y/W意为将位置366

处的氨基酸T取代为氨基酸Y或W。

术语“包括”、“含有”或“包含”及其变体应理解为 “包括但不限于”，意味着除所列出的要素、组分和步骤外，还可涵盖其它未指明的要素、组分和步骤。

在本文中，除非上下文另有明确规定，否则单数术语涵盖复数指代物，反之亦然。

为了描述和公开的目的，以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它已确定的出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们的公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且，在任何国家，在本文中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。本发明的各个方面将在下述部分中进一步详细描述。

本发明的各个方面将在下述分部中进一步详细描述。

双特异性抗体

本发明将其中一个抗原结合部分的恒定区进行改造，构建的双特异性抗体能够防止或减弱不同特异性的重链和轻链的错配，从而提高目标抗体的产率或/和纯度。具体的，对人MHC-I 分子 α3 结构域和 β2 微球蛋白工程化改造，构建第一配对结构域和第二配对结构域以替换抗体的 CH1 和 CL 结构域，改善链的错配，例如相比于第一和第二抗原结合部分均为天然 Fab 的对应部分的情况，所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分更不容易发生错配。

目前生物药的免疫原性的来源主要分为：内源和外源。内源免疫原性来自非人源的氨基酸序列、非人源的结构形式以及一系列的化学修饰（点突变，结构域融合，糖型改造等）。外源免疫原性主要来源于生产工艺、药品运输、患者的遗传背景、用药剂量、用药频率和方式等相关。随着生物药种类和数量的逐渐增多，及其广泛的应用，与免疫原性相关的问题也逐步引起人们的高度关注。MHC（主要组织相容性复合物）是免疫系统识别的基础，参与机体的适应性免疫过程。基于 MHC 分子组成设计双特异性抗体跟人体免疫环境具有良好的兼容性。相对于 MHC-II 类分子，MHC-I 类分子分布更为广泛，表达于几乎所有有核细胞表面，被 CD8+T 细胞识别。在 HLA-I 分子中，HLA-I-B 类的人的 MHC-I 的分子的数量最多，因此选用基于 HLA-I-B 类的人的 MHC-I 分子的恒定区构建双特异性抗体的结构元件，可以降低免疫原性风险。

此外，基于 HLA-I-B 类的人的 MHC-I 分子的恒定区不含有 N-连接和 O-连接的糖基化位点，具有良好的可开发性和低免疫原性。

实验发现，改造构建的双特异性抗体仍具有良好的抗原结合性能。

本发明提供的双特异性抗体，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分特异性结合两种不同抗原或同一种抗原的不同表位，其中所述第一抗原结合部分包含：

第一多肽，所述第一多肽自 N 端至 C 端包含第一重链可变结构域以及与所述第一重链可变结构域可操作连接的第一配对结构域，和

第二多肽，所述第二多肽自 N 端至 C 端包含第一轻链可变结构域以及与所述第一轻链可变结构域可操作连接的第二配对结构域，

其中，所述第一配对结构域和第二配对结构域中的一个配对结构域包含工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列，另一个配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述第一配对结构域和第二配对结构域能够形成二聚体，所述第一配对结构域和第二配对结构域之间能够形成至少一个非天然链间键且所述非天然链间键能够稳定所述二聚体。

第一配对结构域和第二配对结构域能够形成二聚体，其在第一抗原结合部分的不同位置取向（如与轻链可变区或重链可变区连接）均对抗原有良好的结合亲和力。

其中一种实施方案，所述第一配对结构域包含工程化的 HLA-Iα3 的氨基酸序列，所述第二配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列。

另一种实施方案，所述第一配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列，所述第二配对结构域包含工程化的 HLA-Iα3 的氨基酸序列。

非天然链间键能够稳定第一配对结构域和第二配对结构域形成的二聚体，形成所述非天然链间键的氨基酸残基处于第一配对结构域和第二配对结构域的接触界面，以有效形成键。术语“接触界面”是指在所述多肽上所述多肽彼此相互作用/缔合的特定区域。接触界面包含一个或多个氨基酸残基，其能够在相互作用发生时与接触或缔合的对应的氨基酸残基相互作用。接触界面中的氨基酸残基可处于或可不处于连续的序列中。例如，当所述界面是三维的，所述界面内的氨基酸残基可以分开位于线性序列上的不同位置。

所述非天然链间键的数量为 1-3 个，例如可以为 1 个、2 个或 3 个，为尽可能与天然抗体相似，非天然链间键的数量优选为 1 个。一种实施方案，所述非天然链间键为二硫键。

在一些实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列与 SEQ ID NO：1 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，所述工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO：2 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性。在一些实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列、工程化的 β2 微球蛋白分别与 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 所示序列具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性。

SEQ ID NO：1 所示序列源于多个 HLA-I-B 类分子的恒定区序列比对生成的一致性序列，利用其或对其改造形成配对结构域具有良好的通用性。

在一些实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 包含在 SEQ ID NO：1 具有氨基酸取代的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含在 SEQ ID NO：2 具有氨基酸取代的氨基酸序列。

工程化的 HLA-I α3、工程化的 β2 微球蛋白中的所述氨基酸取代包含形成非天然链间键（例如二硫键）的氨基酸取代或/和提高配对结构域形成的二聚体或双特异性抗体的氨基酸取代。

在一些实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 和工程化的 β2 微球蛋白中的所述氨基酸取代均包含发生在两者接触界面且能够彼此形成二硫键的半胱氨酸残基取代。在一个具体的实施方案中，所述半胱氨酸残基取代为 SEQ ID NO：1 中的 R60C 和 SEQ ID NO：2 中的 Y26C；一个具体的实施方案，所述半胱氨酸残基取代为 SEQ ID NO：1 中的 A62C 和 SEQ ID NO：2 中的 R12C；一个具体的实施方案，所述半胱氨酸残基取代为 SEQ ID NO：1 中的 G63C 和 SEQ ID NO：2 的 Y67C；另一些具体的实施方案，所述半胱氨酸残基取代可以选自上述 R60C/Y26C、A62C/R12C、G63C/Y67C 中的两对或三对。

在一些实施方案中，所述工程化的 HLA-I α3 或/和工程化的 β2 微球蛋白中的氨基酸取代包含提高配对结构域形成的二聚体或双特异性抗体的等电点的氨基酸取代。这些氨基酸取代可以同时发生在两个配对结构域，或者其中任意一个配对结构域。一般提高配对结构域形成的二聚体或双特异性抗体的等电点至 6.5-9.0，以利于生产工艺开发，改善成药性。在一些实施方案中，提高配对结构域形成的二聚体或双特异性抗体的等电点至 6.5-8.5、7.0-8.5、7.0-9.0、7.0-7.8、7.0-8.0、7.5-7.8 或 7.5-8.0。一些具体的实施方案，提高配对结构域形成的二聚体或双特异性抗体的等电点至 6.5、6.7、6.9、7.1、7.3、7.5、7.7、7.8、7.9、8.0、8.2、8.3、8.5、8.7 或 9.0。等电点可以通过实验测定或理论计算，一种理论等电点的计算例如可以使用在线计算分析工具 Expasy-Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/)。

在一些实施方案中，提高等电点的氨基酸取代包含：工程化的 HLA-I α3 在 SEQ ID NO：1 序列的 E3、D22、E48、D53、E90、E101 中的一个或几个位置被正电氨基酸取代。

在一些实施方案中，提高等电点的氨基酸取代包含：工程化的 β2 微球蛋白中在 SEQ ID NO：2 序列的 E74、E47、E69、D34、E16、D53、E44、E50、E36 中的一个或几个位置被正电氨基酸取代。

在一些具体的实施方案中，提高等电点的氨基酸取代包含：所述工程化的 HLA-I α3 在 SEQ ID NO：1 序列的 D22、E48 和 D53 位置被正电氨基酸取代，并且所述工程化的 β2 微球蛋白在 SEQ ID NO：2 序列的 E69 位置被正电氨基酸取代。

在一些实施方案中，所述的正电氨基酸为 K 或 R。

一个更具体的实施方案，提高等电点的氨基酸取代包含：所述工程化的 HLA-I α3 在 SEQ ID NO：1 序列包含氨基酸取代 D22R、E48K 和 D53K，并且所述工程化的 β2 微球蛋白在 SEQ ID NO：2 序列包含氨基酸取代 E69R。

在一些更具体的实施方案中，所述氨基酸取代包含：所述工程化的 HLA-I α3 在 SEQ ID NO：1 序列包含氨基酸取代 A62C、D22R、E48K 和 D53K，并且所述工程化的 β2 微球蛋白在 SEQ ID NO：2 序列包含氨基酸取代 R12C、E69R。进一步的方案，所述工程化的 β2 微球蛋白包含在 SEQ ID NO：2 序列的羧基端添加的“GP”。

一个具体的实例，所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列。

另一个具体的实例，所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述第二抗原结合部分包含第二重链可变结构域和第二轻链可变结构域。所述第二抗原结合部分不包含本发明所述的第一配对结构域和第二配对结构域。一个具体的实施方案，所述第二抗原结合部分包含 Fab。所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分特异性结合两种不同抗原或同一种抗原的不同表位，在一些实施方案中，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分均单价结合各自的抗原。

在一些实施方案中，根据 EU 编号，所述 Fab 的 CL 结构域在 T/S114、T/F116、F118 位置中的一个或多个被疏水氨基酸取代，在一些实施方案中，所述的疏水氨基酸选自非芳香族例如甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或亮氨酸。在第二抗原结合部分的 Fab 的 CL 结构域引入适宜的氨基酸取代，可以进一步降低轻重链的错配。一个具体的实例，根据 EU 编号，所述 Fab 的 CL 结构域在 F118 位置的氨基酸被丙氨酸（A）取代。在另一些实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域在根据 EU 编号的 F118 位置被丙氨酸取代，且所述 CL 结构域还包含其他的取代，例如是进一步降低 CL 与包含工程化的 HLA-Iα3 的配对结构域的错配的取代。

在一些实施方案中，所述 CL 结构域可以源自人 κ 轻链 CL 结构域或人 λ 轻链 CL 结构域。一个具体的实例，含 F118A 的 CL 结构域包含 SEQ ID NO：44 所示的氨基酸序列。一个具体的实例，含 F118A 的 CL 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：44 所示。

在一些实施方案中，所述 Fab 的 CH1 结构域可以是人 IgG（IgG1-4）、IgM、IgA、IgD 或 IgE 的 CH1 结构域，一个具体的实例，所述 Fab 的 CH1 结构域为人 IgG1 的 CH1 结构域。一个具体的实例，CH1 的结构域包含 SEQ ID NO：34 所示的氨基酸序列。一个具体的实例，CH1 的结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：34 所示。一个具体的实例，所述 Fab 的 CH1 结构域为人 IgG4 的 CH1 结构域。

SEQ ID NO：34 所示氨基酸序列如下：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

SEQ ID NO：35 所示氨基酸序列如下：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO：44 所示氨基酸序列如下：

RTVAAPSVFIAPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

在一些具体的实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域在 F118 位置的氨基酸被丙氨酸取代，所述 Fab 的 CH1 结构域在 128 位置（EU 编号）、141 位置（EU 编号）、185 位置（EU 编号）、11 位置（IMGT 编号）、28 位置（IMGT 编号）、或 139 位置（Kabat 编号）不含氨基酸取代。在另一些实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域在根据 EU 编号的 F118 位置被丙氨酸取代，且所述 CL 结构域还包含其他的取代（例如是进一步降低 CL 与包含工程化的 HLA-Iα3 的配对结构域的错配的取代），所述 Fab 的 CH1 结构域在 128 位置（EU 编号）、141 位置（EU 编号）、185 位置（EU 编号）、11 位置（IMGT 编号）、28 位置（IMGT 编号）、或 139 位置（Kabat 编号）不含氨基酸取代。

在一些具体的实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域在 F118 位置的氨基酸被丙氨酸取代，所述 Fab 的 CH1 结构域不含氨基酸取代 L128F（EU 编号）、A141L 位置（EU 编号）、V185A/L（EU 编号）、L11K/F/W（IMGT 编号）、L28N/R（IMGT 编号）、或 A139W/V/I（Kabat 编号）。在另一些实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域在根据 EU 编号的 F118 位置被丙氨酸取代，且所述 CL 结构域还包含其他的取代（例如是进一步降低 CL 与包含工程化的 HLA-Iα3 的配

对结构域的错配的取代)，所述 Fab 的 CH1 结构域不含氨基酸取代 L128F（EU 编号）、A141L 位置（EU 编号）、V185A/L（EU 编号）、L11K/F/W（IMGT 编号）、L28N/R（IMGT 编号）、或 A139W/V/I（Kabat 编号）。

在一些具体的实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域在 F118 位置的氨基酸被丙氨酸取代，所述 Fab 的 CH1 结构域采用野生型免疫球蛋白的 CH1 结构域，例如采用人 IgG 的 CH1 结构域。在另一些实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域在根据 EU 编号的 F118 位置被丙氨酸取代，且所述 CL 结构域还包含其他的取代（例如是进一步降低 CL 与包含工程化的 HLA-Iα3 的配对结构域的错配的取代），所述 Fab 的 CH1 结构域采用野生型免疫球蛋白的 CH1 结构域，例如采用人 IgG（IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4）的 CH1 结构域。

在一些具体的实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域包含与 SEQ ID NO：44 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列，所述 Fab 的 CH1 结构域包含与 SEQ ID NO：34 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性的氨基酸序列。进一步的，在该实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域包含 F118A。进一步的，在该实施方案中，所述 Fab 的 CH1 结构域为野生型免疫球蛋白的 CH1 结构域，或者所述 Fab 的 CH1 结构域在 128 位置（EU 编号）、141 位置（EU 编号）、185 位置（EU 编号）、11 位置（IMGT 编号）、28 位置（IMGT 编号）、或 139 位置（Kabat 编号）不含氨基酸取代。

在一些具体的实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域包含 SEQ ID NO：44 所示的氨基酸序列，所述 Fab 的 CH1 结构域包含 SEQ ID NO：34 所示的氨基酸序列。

在一些具体的实施方案中，所述 Fab 的 CL 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：44 所示，所述 Fab 的 CH1 结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO：34 所示。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的一个结合 T 细胞特异性受体分子和/或天然杀伤细胞特异性受体分子，以及另一个抗原结合部分结合肿瘤相关抗原。

T 细胞特异性受体分子允许 T 细胞结合并且如果存在另外的信号，则由另一种被称为抗原呈递细胞或 APC 的细胞所呈递的表位/抗原激活并对其响应。T 细胞特异性受体分子可以是 TCR、CD3、CD28、CD134(也称为 OX40)、4-1BB、CD5 或 CD95(也称为 Fas 受体)。

NK 细胞特异性受体分子的实例包括 CD16、低亲和力 Fc 受体和 NKG2D，以及 CD2。

术语“肿瘤相关抗原”是指呈现于肿瘤细胞表面上或可以呈现于肿瘤细胞表面上并且位于肿瘤细胞上或肿瘤细胞内的抗原。在一些实施方式中，肿瘤相关抗原可以仅由肿瘤细胞呈递，而不是由正常的即非肿瘤细胞呈递。在一些其他实施方式中，肿瘤相关抗原可以仅在肿瘤细胞上表达，或者可以代表相较于非肿瘤细胞的肿瘤特异性突变。在一些其他实施方式中，肿瘤相关抗原可以在肿瘤细胞和非肿瘤细胞中发现，但是与非肿瘤细胞相比在肿瘤细胞上过表达，或者由于与非肿瘤组织相比肿瘤组织的不太紧密的结构而可以在肿瘤细胞中结合抗体。在一些实施方式中，肿瘤相关抗原位于肿瘤的脉管系统上。一些示例性的肿瘤相关抗原为 CD38、CD47、PD-L1、PD-1 等。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的一个特异性结合 CD3，以及另一个特异性结合肿瘤相关抗原。例如第一抗原结合部分特异性结合 CD3，第二抗原结合部分特异性结合肿瘤相关抗原；或者，第二抗原结合部分特异性结合 CD3，第一抗原结合部分特异性结合肿瘤相关抗原。一些具体的实例，第一抗原结合部分特异性结合 CD3，第二抗原结合部分特异性结合 CD38；或者所述第一抗原结合部分特异性结合 CD38，第二抗原结合部分特异性结合 CD3。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分均特异性结合肿瘤相关抗原。一些具体的实例，所述第一抗原结合部分特异性结合 PD-L1，第二抗原结合部分特异性结合 CD47；或者所述第一抗原结合部分特异性结合 CD47，第二抗原结合部分特异性结合 PD-L1。

在一些实施方案中，所述的双特异性抗体，其进一步包含能够稳定缔合的两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。在一些实施方案中，双特异性抗体是二价的。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。在一

些更具体的实施方案中，所述第一抗原结合部分的第一多肽在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分包含 Fab，其 Fab 重链在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。在一些更具体的实施方案中，所述第一抗原结合部分的第一多肽在其C端与其中一个Fc多肽的N端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分包含Fab，其 Fab 轻链在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。

在一些实施方案中，所述的双特异性抗体，其还包含第三抗原结合部分。一些具体的实施方案，所述的双特异性抗体对抗原的结合是三价的。

在一些实施方案中，所述第三抗原结合部分与第二抗原结合部分结合相同的抗原表位；优选的，所述第三抗原结合部分与第二抗原结合部分相同。在另一些实施方案中，所述第三抗原结合部分与第一抗原结合部分结合相同的抗原表位；优选的，所述第三抗原结合部分与第一抗原结合部分相同。

在一些实施方案中，所述第三抗原结合部分与第一抗原结合部分的 N 端或 C 端可操作性的连接。

在另一些实施方案中，所述第三抗原结合部分与第二抗原结合部分的 N 端或 C 端可操作性的连接。

在一些实施方案中，所述的双特异性抗体包含第三抗原结合部分，还进一步包含能够稳定缔合的两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。

在一些具体的实施方案中，所述第一抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分在其C端与另一个Fc多肽的N端可操作性的连接，所述第三抗原结合部分在其 C 端与第一抗原结合部分的 N 端或第二抗原结合部分的 N 端可操作性的连接。

在另一些具体的实施方案中，所述第三抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第一抗原结合部分在其 C 端与所述第三抗原结合部分的 N 端可操作性的连接，第二抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。

在另一些具体的实施方案中，所述第三抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分在其 C 端与所述第三抗原结合部分的 N 端可操作性的连接，第一抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。

上述第三抗原结合部分与第一抗原结合部分可操作性的连接时，可以为通过肽接头连接。

上述第三抗原结合部分与第二抗原结合部分可操作性的连接时，可为通过肽接头连接。肽接头可以采用任何适宜的，例如可以使用带电的和/或柔性的接头多肽。在具体的实施方案中，肽接头由通过肽键连接的 1 到 50 个氨基酸组成，其中所述氨基酸可以选自 20 个天然存在的氨基酸；在更优选的实施方案中，1 到 50 个氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺和赖氨酸。因此，示例性的肽接头可以是聚甘氨酸(尤其是(Gly)4、(Gly)5)、聚(Gly-Ser)、(Gly)3AsnGlySer(Gly)2、(Gly)3Cys(Gly)4、GlyProAsnGlyGly，或者专利申请 WO2019195535 的表 4 所公开的那些，等等。在一些实施方案中，所述肽接头可以是由甘氨酸和丝氨酸组成的肽接头。在一些实施方案中，所述肽接头包含的氨基酸数目可以是 0 个、1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、或 20 个以上。

当抗原结合部分与 Fc 域或 Fc 多肽可操作性的连接时，典型的是通过铰链区连接。铰链例如包含人 IgG 的铰链区的氨基酸。

Fc 域

双特异性抗体的 Fc 域由一对包含免疫球蛋白分子重链结构域的多肽链组成。例如，免疫球蛋白 G(IgG)分子的 Fc 域是二聚体，其每个 Fc 多肽包含 CH2 和 CH3 IgG 重链恒定区。Fc 域的两个 Fc 多肽能够彼此稳定缔合。例如两个 Fc 多肽通过连接子、二硫键、氢键、静电相互作用、盐桥、疏水-亲水相互作用中的一种或几种稳定缔合。在一个实施方案中，本发明的双特异性抗体包含一个 Fc 域。

在一个实施方案中，双特异性抗体的 Fc 域是 IgG Fc 域。在一个具体的实施方案中，Fc 域是 IgG1 Fc 域。在另一个实施方案中，Fc 域是 IgG4Fc 域。在一个更具体的实施方案中，Fc 域是包含位置 S228 处的氨基酸替代，特别是氨基酸替代 S228P 的 IgG4 Fc 域，此氨基酸替代降低 IgG4 抗体的体内 Fab 臂交换。在又一个具体的实施方案中，Fc 域是人 Fc 域。在一个更具体的实施方案中，Fc 域是人 IgG1Fc 域。

在一些实施方案中，所述 Fc 域包含修饰，例如氨基酸取代。所述修饰例如可以是促进异二聚化的修饰、改变效应子功能的修饰、改变与 A 蛋白结合能力的修饰等。

在一些实施方案中，所述 Fc 域包含促进异二聚化的修饰。

本发明的双特异性抗体包含与Fc域中的两个Fc多肽中的一个或另一个融合的不同抗原结合部分，因此，两个 Fc 多肽通常包含在两条不同的多肽链中。这些多肽的重组共表达和随后的二聚化产生两种多肽的几种可能的组合。为了提高重组产生中多特异性抗体的产率和纯度，在该双特异性抗体的 Fc 域中引入促进希望的多肽结合的修饰将是有利的。因此，在具体实施方案中，所述 Fc 域包含促进所述 Fc 域的两个 Fc 多肽相缔合的氨基酸取代。

人 IgG Fc 域的两条 Fc 多肽之间最广泛的蛋白质-蛋白质相互作用的部位在 Fc 域的 CH3 结构域中。因此，在一个实施方案中，该修饰在 Fc 域的 CH3 结构域中。

在具体实施方案中，该修饰是所谓的“杵臼(knob-into-hole)”修饰，其包含 Fc 域的两个 Fc 多肽之一中的“杵”修饰和 Fc 域的两个 Fc 多肽的另一个中的“臼”修饰。通常，该方法涉及在一条 Fc 多肽的界面引入凸起(“杵”)，而在另一条 Fc 多肽的界面引入对应的凹陷(“臼”)，使得该凸起可以定位在该凹陷中，以促进异二聚体形成和妨碍同二聚体形成。通过用更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸等)取代来自一条 Fc 多肽的界面的小的氨基酸侧链来构建凸起。通过用更小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸等)取代大的氨基酸侧链来在另一条 Fc 多肽的界面中产生具有与凸起相同或相似的大小的互补凹陷。

因此，在具体实施方案中，在该双特异性抗体的一个 Fc 多肽的 CH3 结构域中，用具有更大侧链体积的氨基酸残基取代氨基酸残基，从而在该 Fc 多肽的 CH3 结构域内产生可定位在另一个 Fc 多肽的 CH3 结构域内的凹陷中的凸起，在另一个 Fc 多肽的 CH3 结构域中，用具有更小侧链体积的氨基酸残基取代氨基酸残基，从而在该 Fc 多肽的 CH3 结构域内产生凹陷。

在一些具体实施方案中，Fc 域的一个 Fc 多肽包含 T366Y/W 或/和 S354C，且另一个 Fc 多肽包含 Y407T/V、Y349C、T366S 或/和 L368A。一个更具体的实例，所述 Fc 域的其中一个 Fc 多肽包含氨基酸取代 T366Y/W 和 S354C，另一个 Fc 多肽包含氨基酸取代 Y407T/V、Y349C、T366S 和 L368A。在更具体的实例中，Fc 可以是人 IgG1 的 Fc。

在一些实施方案中，所述 Fc 域包含减少或消除 Fc 域中的一个 Fc 多肽的 CH3 区与 A 蛋白(Protein A from Staphylococcus aureus)的结合的修饰。在一些实施方案中，该修饰为氨基酸取代。在一些实施方案中，所述 Fc 域包含氨基酸取代 H435R 或/和 Y436F，该氨基酸取代仅发生在一个 Fc 多肽上，而不发生在另一个 Fc 多肽上。在一个具体的实施方案中，所述 Fc 域包含仅发生在其中一个 Fc 多肽的氨基酸取代 H435R 或/和 Y436F。在一个这种具体的实施方案中，该 Fc 是 IgG1Fc，尤其是人 IgG1Fc。

组合物

本发明提供了药物组合物，所述药物组合物包含双特异性抗体，并且还包含一种或多种药学上可接受的载体。药学上可接受的载体包括，例如，赋形剂、稀释剂、包封材料、填充剂、缓冲剂或其他试剂。

分离的核酸

本发明提供了分离的多核苷酸，其编码所述的双特异性抗体。序列表中示例性的列举了一些双特异性抗体的多肽链的核酸序列。

载体

本发明提供了分离的载体，其包含所述的多核苷酸。在一些实施方案中，所述的载体为克隆载体；在另一些实施方案中，所述的载体为表达载体，一个具体的例子，表达载体为pcDNA3.1。所述表达载体可选的能够表达本文所述多特异性抗体的任意表达载体。

宿主细胞

在一些实施方案中，本发明提供包含所述本发明载体或多核苷酸的宿主细胞，宿主细胞为用于克隆或编码多特异性抗体的适当宿主细胞。在一些实施方案中，宿主细胞为原核细胞。在另一些实施方案中，宿主细胞为真核细胞。在一些实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳细胞或适用于制备多特异性抗体的其他细胞。哺乳细胞例如为中国仓鼠(CHO)卵巢细胞、CHO-S细胞。

表达双特异性抗体的方法

本发明提供了表达本发明所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括在所述双特异性抗

体被表达的条件下培养所述的宿主细胞。

为了产生所述的双特异性抗体，分离编码所述双特异性抗体的多核苷酸，并插入一个或多个载体，用于在宿主细胞中进一步克隆或/和表达。所述多核苷酸可以采用基因拼接、化学合成等多种本领域所熟知的方法获取。

缀合物

本发明提供了一种缀合物，其包含本发明所述的双特异性抗体以及与所述双特异性抗体连接或缀合的治疗剂。

融合蛋白

本发明提供了一种融合蛋白，其中融合组分与本发明所述的双特异性抗体融合表达。可以通过基因工程手段实现融合蛋白分子的构建和表达。

用途

本发明提供了在有需要的受试者中治疗疾病的方法，包括向受试者施用治疗有效量的本发明所述的双特异性抗体、药物组合物、缀合物或融合蛋白。

所述疾病例可以是癌症，非限制性的，一些癌症的示例选自白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌、支气管癌、骨癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、肝细胞癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、肾细胞癌、甲状腺癌、头颈癌、睾丸癌、内分泌腺癌、肾上腺癌、脑下垂体癌、皮肤癌、软组织癌、血管癌、脑癌、神经癌、眼癌、脑膜癌、口咽癌、下咽部癌、宫颈癌、子宫癌、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、胶质瘤、脑膜瘤、胃泌素瘤、成神经细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征以及肉瘤。

本发明还提供以下一些具体实施方式，但并不限于此：

实施方案1. 一种双特异性抗体，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分特异性结合两种不同抗原或同一种抗原的不同表位，其中所述第一抗原结合部分包含：

第一多肽，所述第一多肽自 N 端至 C 端包含第一重链可变结构域以及与所述第一重链可变结构域可操作连接的第一配对结构域，和

第二多肽，所述第二多肽自 N 端至 C 端包含第一轻链可变结构域以及与所述第一轻链可变结构域可操作连接的第二配对结构域，

其中，所述第一配对结构域和第二配对结构域中的一个配对结构域包含工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列，另一个配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列。

实施方案2. 根据实施方案 1 所述的双特异性抗体，其中所述第一配对结构域和第二配对结构域能够形成二聚体，所述第一配对结构域和第二配对结构域之间能够形成至少一个非天然链间键且所述非天然链间键能够稳定所述二聚体。

实施方案3. 根据实施方案 1 或 2 所述的双特异性抗体，其中所述第一配对结构域包含工程化的 HLA-Iα3 的氨基酸序列，所述第二配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列。

实施方案4. 根据实施方案 1 或 2 所述的双特异性抗体，其中所述第一配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列，所述第二配对结构域包含工程化的 HLA-Iα3 的氨基酸序列。

实施方案5. 根据实施方案 1-4 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述非天然链间键为 1-3 个，优选为 1 个。

实施方案6. 根据实施方案 1-5 中任一项所述的双特异性抗体，其中形成所述非天然链间键的氨基酸残基处于第一配对结构域和第二配对结构域的接触界面。

实施方案7. 根据实施方案 1-6 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述非天然链间键为二硫键。

实施方案8. 根据实施方案 1-7 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列与 SEQ ID NO：1 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，所述工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO：2 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性。

实施方案9. 根据实施方案 1-8 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述工程化的 HLA-I α3 包含在 SEQ ID NO：1 具有氨基酸取代的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含在 SEQ ID NO：2 具有氨基酸取代的氨基酸序列。

实施方案10. 根据实施方案 9 所述的双特异性抗体，其中工程化的 HLA-I α3 和工程化的 β2 微球蛋白中的所述氨基酸取代均包含发生在两者接触界面且能够彼此形成二硫键的半胱氨酸残基取代。

实施方案11. 根据实施方案 10 所述的双特异性抗体，其中所述半胱氨酸残基取代选自下组中的一对至多对：

（1）SEQ ID NO：1 中的 R60C 和 SEQ ID NO：2 中的 Y26C；

（2）SEQ ID NO：1 中的 A62C 和 SEQ ID NO：2 中的 R12C；

（3）SEQ ID NO：1 中的 G63C 和 SEQ ID NO：2 中的 Y67C。

实施方案12. 根据实施方案 9-11 中任一项所述的双特异性抗体，其中工程化的 HLA-I α3 或/和工程化的 β2 微球蛋白中的氨基酸取代包含提高配对结构域形成的二聚体或双特异性抗体的等电点的氨基酸取代。

实施方案13. 根据实施方案 12 所述的双特异性抗体，其中提高配对结构域形成的二聚体或双特异性抗体的等电点至 6.5-9.0。

实施方案14. 根据实施方案 12-13 中任一项所述的双特异性抗体，其中提高等电点的氨基酸取代包含：工程化的 HLA-I α3 在 SEQ ID NO：1 序列的 E3、D22、E48、D53、E90、E101 中的一个或几个位置被正电氨基酸取代。

实施方案15. 根据实施方案 12-14 中任一项所述的双特异性抗体，其中提高等电点的氨基酸取代包含：工程化的 β2 微球蛋白中在 SEQ ID NO：2 序列的 E74、E47、E69、D34、E16、D53、E44、E50、E36 中的一个或几个位置被正电氨基酸取代。

实施方案16. 根据实施方案 15 所述的双特异性抗体，其中提高等电点的氨基酸取代包含：所述工程化的 HLA-I α3 在 SEQ ID NO：1 序列的 D22、E48 和 D53 位置被正电氨基酸取代，并且所述工程化的 β2 微球蛋白在 SEQ ID NO：2 序列的 E69 位置被正电氨基酸取代。

实施方案17. 根据实施方案 14-16 任一项所述的双特异性抗体，其中所述的正电氨基酸为 K 或 R。

实施方案18. 根据实施方案 12-13 中任一项所述的双特异性抗体，其中提高等电点的氨基酸取代包含：所述工程化的 HLA-I α3 在 SEQ ID NO：1 序列包含氨基酸取代 D22R、E48K 和 D53K，并且所述工程化的 β2 微球蛋白在 SEQ ID NO：2 序列包含氨基酸取代 E69R。

实施方案19. 根据实施方案 1-18 中任一项所述的双特异性抗体，所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列。

实施方案20. 根据实施方案 1-18 中任一项所述的双特异性抗体，所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列。

实施方案21. 根据实施方案 1-20 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合部分包含第二重链可变结构域和第二轻链可变结构域。

实施方案22. 根据实施方案 1-21 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合部分包含 Fab。

实施方案23. 根据实施方案 22 所述的双特异性抗体，其中根据 EU 编号，所述 Fab 的 CL 结构域在 F118 位置的氨基酸被丙氨酸取代。

实施方案24. 根据实施方案 23 所述的双特异性抗体，所述 CL 结构域包含 SEQ ID NO：44 所示的氨基酸序列。

实施方案25. 根据实施方案 1-24 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的一个结合 T 细胞特异性受体分子和/或天然杀伤细胞特异性受体分子，以及另一个抗原结合部分结合肿瘤相关抗原。

实施方案26. 根据实施方案 1-24 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分中的一个特异性结合 CD3，以及另一个特异性结合肿

瘤相关抗原。

实施方案27. 根据实施方案 1-24 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分均特异性结合肿瘤相关抗原。

实施方案28. 根据实施方案 25-27 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述肿瘤相关抗原为 CD38、CD47、PD-L1 或 PD-1。

实施方案29. 根据实施方案 26 所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分特异性结合 CD3，第二抗原结合部分特异性结合 CD38；或者，所述第一抗原结合部分特异性结合 CD38，第二抗原结合部分特异性结合 CD3。

实施方案30. 根据实施方案 27 所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分特异性结合 PD-L1，第二抗原结合部分特异性结合 CD47；或者所述第一抗原结合部分特异性结合 CD47，第二抗原结合部分特异性结合 PD-L1。

实施方案31. 根据实施方案 1-30 中任一项所述的双特异性抗体，所述双特异性抗体为二价的。

实施方案32. 根据实施方案 1-30 中任一项所述的双特异性抗体，其还包含第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分与第二抗原结合部分结合相同的抗原表位；优选的，所述第三抗原结合部分与第二抗原结合部分相同。

实施方案33. 根据实施方案 1-30 中任一项所述的双特异性抗体，其还包含第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分与第一抗原结合部分结合相同的抗原表位；优选的，所述第三抗原结合部分与第一抗原结合部分相同。

实施方案34. 根据实施方案 32 或 33 所述的双特异性抗体，其中所述第三抗原结合部分与第一抗原结合部分的 N 端或 C 端可操作性的连接。

实施方案35. 根据实施方案 32 或 33 所述的双特异性抗体，其中所述第三抗原结合部分与第二抗原结合部分的 N 端或 C 端可操作性的连接。

实施方案36. 根据实施方案 32-35 中任一项所述的双特异性抗体，所述双特异性抗体为三价的。

实施方案37. 根据实施方案 1-31 中任一项所述的双特异性抗体，其进一步包含能够稳定缔合的两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。

实施方案38. 根据实施方案 37 所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。

实施方案39. 根据实施方案 38 所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分的第一多肽在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分包含 Fab，其 Fab 重链在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。

实施方案40. 根据实施方案 32-36 中任一项所述的双特异性抗体，其进一步包含能够稳定缔合的两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。

实施方案41. 根据实施方案 40 所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第三抗原结合部分在其 C 端与第一抗原结合部分的 N 端或第二抗原结合部分的 N 端可操作性的连接。

实施方案42. 根据实施方案 40 所述的双特异性抗体，其中所述第三抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第一抗原结合部分在其 C 端与所述第三抗原结合部分的 N 端可操作性的连接，第二抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。

实施方案43. 根据实施方案 40 所述的双特异性抗体，其中所述第三抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分在其 C 端与所述第三抗原结合部分的 N 端可操作性的连接，第一抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。

实施方案44. 根据实施方案 41-43 所述的双特异性抗体，其中所述第三抗原结合部分与第一抗原结合部分可操作性的连接为通过肽接头连接，或者所述第三抗原结合部分与第二抗原结合部分可操作性的连接为通过肽接头连接。

实施方案45. 根据实施方案 37-44 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述 Fc 域

是 IgG Fc 域。

实施方案46. 根据实施方案 45 所述的双特异性抗体，其中所述 IgG Fc 域是人 IgG Fc 域，优选为人 IgG1 或人 IgG4 的 Fc 域。

实施方案47. 根据实施方案 37-46 中任一项所述的双特异性抗体，其中两个 Fc 多肽通过连接子、二硫键、氢键、静电相互作用、盐桥、疏水-亲水相互作用中的一种或几种稳定缔合。

实施方案48. 根据实施方案 37-47 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述 Fc 域包含促进所述 Fc 域的两个 Fc 多肽缔合的修饰。

实施方案49. 根据实施方案 37-48 中任一项所述的双特异性抗体，其中根据 EU 编号，其中一个 Fc 多肽包含 T366Y/W 和 S354C，另一个 Fc 多肽包含 Y407T/V、Y349C、T366S 和 L368A。

实施方案50. 根据实施方案 37-49 中任一项所述的双特异性抗体，所述 Fc 域包含减少或消除 Fc 中的一个 Fc 多肽的 CH3 区与 A 蛋白的结合的修饰。

实施方案51. 根据实施方案 37-50 中任一项所述的双特异性抗体，其中，根据 EU 编号，所述 Fc 域包含仅发生在其中一个 Fc 多肽的氨基酸取代 H435R 或/和 Y436F。

实施方案52. 一种分离的多核苷酸，其编码根据实施方案 1-51 中任意一项所述的双特异性抗体。

实施方案53. 一种分离的载体，其包含根据实施方案 52 所述的多核苷酸。

实施方案54. 一种宿主细胞，其包含根据实施方案 52 所述的分离的多核苷酸，或根据实施方案 51 所述的分离的载体。

实施方案55. 一种表达根据实施方案 1-51 中任一项所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括在所述双特异性抗体被表达的条件下培养根据实施方案 52 所述的宿主细胞。

实施方案56. 一种药物组合物，其包含根据实施方案 1-51 中任一项所述的双特异性抗体以及药学上可接受的载体。

实施方案57. 一种缀合物，其包含实施方案 1-51 中任一项所述的双特异性抗体以及与所述双特异性抗体连接或缀合的治疗剂。

实施方案58. 一种融合蛋白，其包含融合表达的融合组分以及实施方案 1-51 中任一项所述的双特异性抗体。

实施方案59. 一种在有需要的受试者中治疗疾病的方法，包括向受试者施用治疗有效量的根据实施方案 1-51 中任一项所述的双特异性抗体、实施方案 56 所述的药物组合物、实施方案 57 所述的缀合物或实施方案 58 所述的融合蛋白。

具体实施方式

实施例 1 MHC-I 元件序列的设计

根据 IPD-IMGT/HLA（https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html）数据库（3.42 版本）统计（表 1），相对于 HLA-II，HLA-I 具有更多的等位基因数目和更加广泛的分布，因此选用 HLA-I 分子设计双特异性抗体的结构元件，以降低免疫原性风险。

根据 IPD-IMGT/HLA 数据库（3.42 版本）统计（表 2），在 HLA-I 分子中，HLA-I-B 等位基因的数量最多，因此选用 HLA-I-B 分子设计双特异性抗体的结构元件，以进一步降低免疫原性风险。

表 1. HLA 等位基因数量

等位基因	数目
HLA-I	20,597
HLA-II	7,723
HLA	28,320

表 2. HLA-I 等位基因和蛋白

类型	A	B	C	E	F	G
等位基因	6,291	7,562	6,223	256	45	82
蛋白	3,896	4,803	3,618	110	6	22
无效（nulls）	325	253	272	7	0	4

1.1 MHC-I 元件初始序列的确定

在 Uniprot（https://www.uniprot.org/）数据库，获取一系列天然 HLA-I -B 分子α链全长序列(表 3)；在 Uniprot 数据库，获取 HLA-I 分子的β链(也称为β微球蛋白)全长序列(Uniprot ID: P61769)。通过 Uniprot 数据库页面的交叉索引系统，进一步获得含有 HLA-I-B 分子α链的蛋白质晶体数据信息，为了确保晶体数据的准确性，选取了高分辨率的晶体结构（Resolution<2 Å）(表 4)。

通过序列分析，并结合这些晶体结构的信息，确定天然 HLA-I-B 分子α链恒定区（此处定义为 MHCICα, constant region alpha of MHC I，或简称 Cα）的相对起始位置。HLA-I-B 分子α链恒定区存在一定的序列多样性，通过使用在线比对工具 ClustalW2（https://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/simple_phylogeny/)对表 3 中的序列进行多序列比对，然后将比对结果通过 webLogo（http://weblogo.berkeley.edu/）进行分析和展示，根据每个位置上氨基酸出现的频率，获得 HLA-I-B 分子α链恒定区的一致性序列（图 1），并将 HLA-I-B 分子α链恒定区一致性序列作为后续操作和改造的初始序列。由于人类的β2微球蛋白没有序列多样性，通过分析序列（Uniprot ID: P61769），确定天然β2微球蛋白与 MHCICα的配对区域（此处定义为 MHCICβ, constant region beta of MHC I，或简称 Cβ）的序列。

MHC-I 元件初始序列如下：

> MHCICαori（SEQ ID NO：1）

GKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRP AGDRTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPS

>MHCICβori （SEQ ID NO：2）

IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSF YLLYYTEFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDR

表 3. Uniprot 数据库中含有天然 HLA-I-B 分子α链的序列信息

序号	Uniprot 登录号
1	A0A140T9S9
2	A0A140T9G0
3	A0A140T9H3
4	A0A140T9A9
5	A0A140T951
6	A0A1W2PPR8
7	D9J307
8	S6AU73
9	Q2L6G2
10	D5H3J5
11	Q5SS57
12	P30685
13	P01889

表 4. 含有 HLA-I-B 分子α链的蛋白质晶体结构

序号	PDB 登录号	分辨率 (Å)	序号	PDB 登录号	分辨率 (Å)	序号	PDB 登录号	分辨率 (Å)	序号	PDB 登录号	分辨率 (Å)
1	1K5N	1.09	31	6PYL	1.52	61	1N2R	1.7	91	4O2C	1.8
2	4U1M	1.18	32	6PZ5	1.53	62	1SYV	1.7	92	4PR5	1.8
3	3CZF	1.2	33	1UXS	1.55	63	1ZSD	1.7	93	5IEK	1.8
4	6MT3	1.21	34	3VFV	1.55	64	2NW3	1.7	94	5VUE	1.8
5	3BWA	1.3	35	6MT4	1.55	65	3DX6	1.7	95	5VWD	1.8
6	3LN4	1.3	36	6MT5	1.55	66	3L3I	1.7	96	5VWF	1.8
7	3SPV	1.3	37	5WMR	1.58	67	3VCL	1.7	97	5WMN	1.82
8	6MT6	1.31	38	6BXQ	1.58	68	4QRQ	1.7	98	5DEG	1.83
9	2BVP	1.35	39	4U1H	1.59	69	5EO0	1.7	99	6D2R	1.83
10	6MTL	1.35	40	6P23	1.59	70	5TXS	1.7	100	3KPQ	1.84
11	4U1J	1.38	41	6P27	1.59	71	5XOS	1.7	101	3BP4	1.85
12	6PYW	1.38	42	1M6O	1.6	72	1UXW	1.71	102	3VFS	1.85
13	2A83	1.4	43	1ZHK	1.6	73	3D18	1.74	103	5EO1	1.85
14	4QRS	1.4	44	3DX7	1.6	74	3BW9	1.75	104	3B3I	1.86
15	4QRT	1.4	45	3KPM	1.6	75	6BJ8	1.75	105	3C9N	1.87
16	5WMQ	1.4	46	3SKO	1.6	76	4U1S	1.76	106	6D29	1.88
17	6P2C	1.4	47	3VRI	1.6	77	5T6Y	1.76	107	1JGD	1.9
18	4XXC	1.43	48	4G8I	1.6	78	4U1N	1.77	108	1M05	1.9
19	5IB2	1.44	49	4G9D	1.6	79	1XR9	1.79	109	2H6P	1.9
20	6PYJ	1.44	50	4LCY	1.6	80	2AXF	1.8	110	3KPP	1.9
21	6BXP	1.45	51	4QRU	1.6	81	3B6S	1.8	111	3LKS	1.9
22	6PYV	1.45	52	5DEF	1.6	82	3BP7	1.8	112	3LN5	1.9
23	1OGT	1.47	53	5WMP	1.6	83	3L3D	1.8	113	3VRJ	1.9
24	1XH3	1.48	54	5WMO	1.62	84	3LKO	1.8	114	4G9F	1.9
25	6P2F	1.48	55	2BVO	1.65	85	3LKP	1.8	115	4JQX	1.9
26	1ZHL	1.5	56	3VFU	1.65	86	3LKQ	1.8	116	4O2F	1.9
27	2HJL	1.5	57	4PRN	1.65	87	3SKM	1.8	117	5T6W	1.9
28	4JQV	1.5	58	5VWH	1.65	88	3VH8	1.8	118	5VUF	1.9
29	5IEH	1.5	59	6P2S	1.65	89	3X12	1.8	119	6BJ3	1.9
30	6AT5	1.5	60	5T6X	1.69	90	3X13	1.8	120	6D2T	1.9

1.2 MHC-I 元件初始序列的优化

1.2.1、链间二硫键的引入以增强 MHC-I 元件的配对稳定性

将上述 MHCICαori 和 MHCICβori 氨基酸序列同时载入 MOE（Molecular Operating Environment）软件，通过 MOE 的 Homology modeling 模块对其进行异源二聚体建模，从而获得 MHC-I 元件的模拟结构。天然状态下，MHC 分子的恒定区之间无二硫键存在。为提高 MHC-I 恒定区的配对稳定性，优化其可开发性，在 MHCICα和 MHCICβ的结构域接触界面上，对于 MHCICαori，在 R60、A62 或 G63 位置可以引入半胱氨酸（Cys）；对于MHCICβori 在 Y26、R12 或 Y67 位置可以引入半胱氨酸（Cys）。通过 MOE 的 Disulfide scan 模块，模

拟计算二硫键引入后的 delta Stability，其中在 MHCICαori 中引入 A62C 突变，在MHCICβori 中引入 R12C 突变，其 delta stability 最低，为-1.62 kcal/mol，说明这两个位置的突变可以在 Cα和 Cβ的界面形成最稳定的二硫键（表 5）。

表 5. MHCICαori 和 MHCICβori 的界面二硫键引入的模拟结果

MHCICαori	MHCICβori	delta Stability (kcal/mol)
R60C	Y26C	1.96
A62C	R12C	-1.62
G63C	Y67C	1.86

1.2.2、等电点优化

初始序列引入二硫键（表 5 中的 A62C 和 R12C）后的 MHC-I 元件的理论等电点（pI, isoelectric point）为 5.80，不利于后期的工艺开发。因此我们对 MHC-I 元件进行相关电荷改造，以改善其成药性。通过 MOE 软件的 Protein-properties 模块对 MHC-I 元件进行溶剂可及性表面（SAS, solvent accessible surface）和带电氨基酸残基等分析。MHC-I 元件中，氨基酸残基溶剂暴露程度>40%且表现出负电荷/酸性的氨基酸残基见表 6。同时结合相关残基所处的结构环境、化学环境和应用目的，将这些酸性氨基酸残基中的一个或多个替换成碱性氨基酸残基（精氨酸（R）或赖氨酸（K）），将 MHC-I 元件的理论等电点提高至 6.5-9.0。一种具体的方案，在 MHCICα，引入 D22R, E48K 和 D53K 三个位点的突变；在 MHCICβ，引入 E69R 单点突变，将 MHC-I 元件的理论等电点提高至 7.8。

表 6. MHC-I 元件 SAS 和残基电荷性质分子

亚基序列	氨基酸残基	位置	酸碱性	溶剂暴露程度 (%)	酸性解离常数 pKa
MHCICαori	ASP	22	酸性	85.17	3.19
MHCICαori	GLU	48	酸性	67.65	3.54
MHCICαori	GLU	3	酸性	53.81	3.72
MHCICαori	GLU	90	酸性	51.81	4.78
MHCICαori	GLU	101	酸性	44.6	2.56
MHCICαori	ASP	53	酸性	43.3	3.37
MHCICβori	GLU	74	酸性	67.85	3.91
MHCICβori	GLU	47	酸性	64.08	3.17
MHCICβori	GLU	69	酸性	49.51	3.84
MHCICβori	ASP	34	酸性	48.31	3.1
MHCICβori	GLU	16	酸性	47.83	3.65
MHCICβori	ASP	53	酸性	47.27	2.31
MHCICβori	GLU	44	酸性	44.71	2.32
MHCICβori	GLU	50	酸性	41.72	3.98
MHCICβori	GLU	36	酸性	40.96	2.81

1.2.3、其他优化

考虑到 Cβ区结尾的 4 个氨基酸(-KWDR)，它们的侧链较大，其可能造成潜在的空间位阻效应。如果采用柔性的 G4S 连接肽会降低蛋白质构象的稳定性。甘氨酸(G)和脯氨酸(P)的结构特点决定这两个氨基酸都主要位于无规则卷曲或者转角位置，其次甘氨酸没有侧链基团，可以很好地缓解空间位阻效应，而脯氨酸的侧链是五元环结构，具备一定的刚性，可以

提高构象稳定性，因此最终在Cβ区的羧基端添加GP，以平衡潜在的空间位阻效应和构象稳定性。

一种MHC-I元件优化序列如下：

> Cα(SEQ ID NO：3)

GKETLQRADPPKTHVTHHPISRHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGKDQTQKTELVETR PCGDRTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPS

>Cβ (SEQ ID NO：4)

IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSF YLLYYTRFTPTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRGP

实施例2 MHC-I元件修饰双特异性IgG4抗体的构建和表征

为了确保MHC-I元件能够用于双特异性抗体，选择达雷木抗体（daratumumab）和靶向人的CD3抗体SP34构建靶向CD3和CD38的双特异性抗体进行早期概念验证和考察Cα和Cβ相对取向对MHC-I元件修饰的抗原结合部分的影响。为了避免或缓解IgG重链之间的错配，后续构建的双特异性抗体都采用“杵臼”结构（knobs into holes）。SP34 Fab的IgG恒定区结构域CH1/CL分别由对应的Cα/Cβ和Cβ/Cα替换，构建相对不同取向的MHC-I修饰的抗原结合部分，并且SP34臂的重链采用“臼”结构，即CH3-hole。达雷木单抗的Fab保持不变，其重链采用“杵”结构，即CH3-knob。将MHC-I修饰的靶向CD3的抗原结合部分与达雷木单抗的Fab组合从而产生两种不同的双特异性抗体，分别命名为MHI383-1122-IgG4和MHI383-1133-IgG4（分子结构参见图2），序列如表7。MHC-I元件采用SEQ ID NO：3所示序列的Cα和SEQ ID NO：4所示序列的Cβ。

表7. 双特异性抗体MHI383-1122-IgG4和MHI383-1133-IgG4序列

名称	组成多肽链	氨基酸序列	核苷酸序列
MHI383-1122-IgG4	H1	SEQ ID NO：6	SEQ ID NO：7
	L1	SEQ ID NO：8	SEQ ID NO：9
	H2	SEQ ID NO：10	SEQ ID NO：11
	L2	SEQ ID NO：12	SEQ ID NO：13
MHI383-1133-IgG4	H1	SEQ ID NO：6	SEQ ID NO：7
	L1	SEQ ID NO：8	SEQ ID NO：9
	H3	SEQ ID NO：14	SEQ ID NO：15
	L3	SEQ ID NO：16	SEQ ID NO：17

对于每种双特异性抗体，将编码组成抗体的各多肽链的DNA序列分别插入载体中，获得表达相应多肽链的表达载体。将编码每种多特异抗体多肽链的表达载体各25 μg共转染ExpiCHO-S细胞（厂家：上海医药工业研究院，货号：127200005），转染表达体积100 ml，细胞密度为6E+06 cells/ml。

转染后将细胞于32℃、5% CO_2、130 rpm条件下表达培养，第8天收取细胞上清液，Protein A磁珠（厂家：金斯瑞，货号：L00695-20）一步纯化抗体蛋白。细胞上清液加入4 ml磁珠放入50 ml离心管中，置于回旋式脱色摇床（厂家：上海智城，型号：ZHWY-304。）上室温孵育2小时。应用磁力架底座吸附磁珠，弃上清并用缓冲液充分洗涤磁珠，使用pH 3.0的0.1 mol/L的甘氨酸（厂家：国药集团，货号：62011516）洗脱抗体蛋白，洗脱液置于超滤管（厂家：Millipore，货号：UFC501096）中浓缩并用1×PBS（厂家：上海生工，货号：B040100-0005）进行缓冲液置换，纯化获得MHI383-1122-IgG4和MHI383-1133-IgG4。

2.1 BLI检测双特异性抗体与抗原的结合亲和力

分别以人的 CD38 蛋白（北京百普赛斯，货号：CD8-H5224）和人的 CD3E（北京百普赛斯，货号：CDE-H5223）为抗原，通过生物干涉膜技术（BLI）分别测定 MHI383-1122-IgG4 和 MHI383-1133-IgG4 对人的 CD38 和 CD3E 蛋白的亲和力。具体实验方法如下：

亲和力测定用于评价 MHI383-1122-IgG4 和 MHI383-1133-IgG4 对人的 CD38 和 CD3E 蛋白的亲和力。亲和力测定主要通过 BLI 技术完成。分别将 MHI383-1122-IgG4 或 MHI383-1133-IgG4 固化至传感器上，再将传感器分别浸入一定浓度梯度的人的 CD38 和 CD3E 蛋白溶液之中，Data Acquisition 11.0.0.64 实时采集结合解离曲线，并通过 Data Analysis 11.0 进行数据分析，得出结合速率常数 Ka、解离速率常数 Kd 和平衡常数 KD，平衡常数 KD 即表示亲和力。

表 8. MHI383-1122-IgG4 和 MHI383-1133-IgG4 的亲和力（BLI）

样品	抗原	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)	抗原	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)
MHI383-1122-IgG4	human CD3E	2.05E+05	2.46E-04	1.20E-09	human CD38	2.17E+05	3.69E-03	1.70E-08
MHI383-1133-IgG4	human CD3E	1.43E+05	9.17E-05	6.41E-10	human CD38	2.94E+05	1.80E-03	6.14E-09

实验结果表明，不同 Cα/Cβ 取向的双特异性抗体 MHI383-1122-IgG4 和 MHI383-1133-IgG4 都对人的 CD38 和 CD3E 蛋白表现出良好的亲和力，彼此间的亲和力 KD 数值差异＜3 倍，主要是由其解离速率常数 Kd 损失造成的（表 8）。因此，MHC-I 元件（Cα 和 Cβ）可以替换 CH1 和 CL 结构域用于构建双特异性抗体。

实施例 3 MHC-I 元件修饰双特异性 IgG1 抗体构建和表征

为了避免或缓解 IgG 重链之间的错配，构建的双特异性抗体都采用“杵臼”结构（knobs into holes）。为了测试 MHC-I 元件（SEQ ID NO：3 所示序列的 Cα和 SEQ ID NO：4 所示序列的 Cβ）对不同 IgG 亚型双特异性抗体的影响，我们将上述 MHI383-1122-IgG4 改造成 IgG1 形式，产生新的双特异性抗体，命名为 MHI383-ccff-IgG1（构建结构如图 3）。该抗体的两条重链的 CH2 结构域均采用 LALA（L234A+L235A）双突变以消除潜在的 Fc effector 效应。在本实施例中，MHC-I 元件修饰重链的 CH3 结构域中，引入了 H435R+Y436F（EU 编号）双突变，含有 H435R+Y436F 双突变的重链错配产物不与 protein A 结合，从而在 protein A 亲和色谱纯化中被去除，提高目的双特异性抗体的纯度和纯化效率。

MHI383-ccff-IgG1 具有四条多肽链（Hc、Lc、Hf 和 Lf），序列如下：

Hc：氨基酸序列如 SEQ ID NO：18 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO：19 所示；

Lc：氨基酸序列如 SEQ ID NO：20 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO：21 所示；

Hf：氨基酸序列如 SEQ ID NO：22 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO：23 所示；

Lf：氨基酸序列如 SEQ ID NO：24 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO：25 所示；

洗脱的目标蛋白峰使用 SuperdexTM 200 Increase 10/300GL 柱及 GE 的 AKTA 系统进行制备型分子排阻色谱继续纯化。该纯化实验使用平衡液（50 mM Tris-HAc，150mM L-Arg-HCl，pH 7.5），以 0.8 ml/min 流速进行。图 4 为 MHI383-ccff-IgG1 分子 SEC 纯化图谱，收集 SEC 主峰（保留时间 RT=7.174 min），以用于后续质谱分析。通过液质联用的方法，对上述 SEC 主峰进行完整分子量鉴定。

采用 Waters LC-MS 系统(Waters, Singapore, USA, UK)进行完整分子量分析。采用 MAbPac RP 4 μm 2.1×50 mm (Thermo, USA)色谱柱；以 A 相（0.1%甲酸水溶液）、B 相（0.1%甲酸乙腈溶液）为流动相，检测波长为 280 nm。取 1 μg 蛋白注入液质联用仪，梯度为：5.5 分钟内，5%B~100%B。质谱仪采用正离子模式，扫描范围：200-4000 m/z。采用 MassLynx 4.1 采集数据，并通过 UNIFI 1.8.2.169 进行数据处理。质谱结果表明，149934Da 处的峰（图

5）与预期的正确组装的双特异性抗体 MHI383-ccff-IgG1 完整分子量相符合。

基于序列模式分析 MHC-I 元件的氨基酸序列，我们未发现 N-连接的糖基化位点基序（NXS/T，X=任何氨基酸除了脯氨酸）。但是 O-连接糖基化位点难以从序列中预测。因此进一步通过使用糖苷酶 PNGaseF 水解切除上述 SEC 主峰蛋白中存在的 N 糖。采用串联质谱的方法，对 N 糖切除后的蛋白进行肽图表征（蛋白测序），考察是否存在可能的 O-糖基化位点。

采用 Waters LC-MS 系统(Waters, Singapore, USA, UK)进行肽序列覆盖率分析。采用 AdvanceBio Peptide Map 2.1×150 mm 2.7-Micron (Aglient, USA)色谱柱；以 A 相（0.1%甲酸水溶液）、B 相（0.1%甲酸乙腈溶液）为流动相，检测波长为 214 nm。PNGaseF 处理后的蛋白经变性、还原和烷基化后，胰蛋白酶酶切过夜。取适量酶切后蛋白注入液质联用仪检测。洗脱梯度为，13 min 内：0%B~15%B；45 min 内：15%B~40%B。质谱仪采用正离子模式，扫描范围：100-2000 m/z。采用 MassLynx 4.1 采集数据，并通过 UNIFI 1.8.2.169 进行数据处理。

肽图实验结果同时表明 MHI383-ccff-IgG1 分子中不存在任何 O-连接糖基化的修饰，从而说明 MHC-I 元件中也不存在任何 O-连接糖基化位点。相对于基于 TCR 修饰的双特异性抗体，MHC-I 元件修饰的双特异抗体具有更低水平的糖型异质性，更有利于下游的工艺开发和质量控制。

实施例 4 突变位点的设计及链错配验证

抗体 HZ5G11 靶向于人 PD-L1 蛋白的胞外段，以及抗体 HZ14A9 靶向于人 CD47 蛋白的胞外段，均为相应抗原免疫小鼠后经杂交瘤筛选、并经人源化后所得到的单克隆抗体。

靶向人的 PD-L1 单克隆 IgG1K 抗体 HZ5G11 由重链 HZ5G11VH-CH1-IgG1（重链氨基酸序列如 SEQ ID NO：26 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO：27 所示）和轻链 HZ5G11VL-IgK 组成（轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO：28 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO：29 所示），靶向人的 CD47 单克隆 IgG1K 抗体 HZ14A9 由重链 HZ14A9VH-CH1-IgG1（重链氨基酸序列如 SEQ ID NO：45 所示）和轻链 HZ14A9VL-IgK（轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO：46 所示）组成。进一步构建基于 MHC-I 元件的 HZ14A9 和 HZ5G11 相关的变体：HZ14A9 抗体重链的 IgG1 恒定区结构域 CH1 由对应的 MHC-I 元件中的 MHCICα (SEQ ID NO：3)替换，产生重链 HZ14A9VH-Cα-IgG1（重链氨基酸序列如 SEQ ID NO：47 所示），HZ14A9 抗体轻链的 IgK 恒定区结构域 CL 由对应的 MHC-I 元件中的 MHCICβ(SEQ ID NO：4)替换，产生轻链 HZ14A9VL-Cβ（轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO：48 所示）；HZ5G11 抗体重链的 IgG1 恒定区结构域 CH1 由对应的 MHC-I 元件中的 MHCICα替换，产生重链 HZ5G11VH-Cα-IgG1（重链氨基酸序列如 SEQ ID NO：30 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO：31 所示），HZ5G11 抗体轻链的 IgK 恒定区结构域 CL 由对应的 MHC-I 恒定区元件中的 MHCICβ替换，产生轻链 HZ5G11VL-Cβ（轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO：32 所示，核苷酸序列如 SEQ ID NO：33 所示）。

为了验证 MHC-I 元件 MHCICα，MHCICβ与抗体恒定区 CH1，轻链恒定区 CL 之间是否存在可能的相互作用，按照表 9 所示，将分别构建编码不同重链或轻链的质粒，组合后进行配对表达纯化。具体的：合成 DNA 序列，将编码重链和轻链的 DNA 序列分别插入载体（例如 CN107001463A 披露的 pcDNA3.1 载体，CN109422811A 披露的 pCHO1.0 载体，等），获得表达相应重链或轻链的重组表达载体。将表达重链和轻链的重组表达载体按照质量比 1：1 的比例共转染 ExpiCHO-S 细胞（厂家：上海医药工业研究院，货号：127200005），转染表达体积 0.1~1L，细胞密度为 6E+06 cells/ml 的 ExpiCHO-S（厂家：上海医药工业研究院，货号：127200005）。

转染后将细胞置于 ExpiCHO™ 培养基（厂家：Thermo，货号：A2910001)中，于 32℃、5% CO_2、130 rpm 条件下表达培养，第 10 天收取细胞上清液，使用来自 GE 的 AKTA Pure 25 L 系统和 MabSelect SuRe LX 填料对目标蛋白进行 proteinA 亲和层析纯化。洗脱后，使用 NanoDrop Lite（Thermo Fisher Scientific）测量洗脱收获的蛋白浓度，SEC-HPLC 检测洗脱的蛋白纯度，用于测试的样品蛋白纯度不低于 80%。每个样品取总量为 5 mg 蛋白进行非还原

SDS-PAGE 电泳，经考马斯亮蓝染色后观察电泳结果。

表 9. 不同重链/轻链配对表达组合

组合	重链	轻链
1	HZ5G11VH-CH1-IgG1	HZ5G11VL-IgK
2	HZ14A9VH-CH1-IgG1	HZ14A9VL-IgK
3	HZ5G11VH-CH1-IgG1	HZ14A9VL-IgK
4	HZ14A9VH-CH1-IgG1	HZ5G11VL-IgK
5	HZ5G11VH-Cα-IgG1	HZ14A9VL-IgK
6	HZ14A9VH-CH1-IgG1	HZ5G11VL-Cβ
7	HZ14A9VH-Cα-IgG1	HZ5G11VL-IgK
8	HZ5G11VH-CH1-IgG1	HZ14A9VL-Cβ

如图 6 所示，实验结果表明基于 HZ5G11 和 HZ14A9 单克隆抗体之间分别交换轻重链，仍有杂合配对产物生成，且杂合配对产物的分子量介于 HZ5G11 和 HZ14A9 单克隆抗体之间。HZ5G11VH-Cα-IgG1 与 HZ14A9VL-IgK，以及 HZ14A9VH-Cα-IgG1 与 HZ5G11VL-IgK 的共表达纯化后，均有多种产物生成。其中 HZ5G11VH-Cα-IgG1 与 HZ14A9VL-IgK 组合表现为杂合配对产物的分子量位于 130-180kDa 之间，跟 HZ5G11 和 HZ14A9 单克隆抗体接近。而 HZ14A9VH-Cα-IgG1 与 HZ5G11VL-IgK 组合表现杂合配对产物的分子量位于 100-130kDa 之间，跟 HZ5G11 和 HZ14A9 单克隆体较易于区分。以上表明 CL 结构域与 MHCICα之间存在某些相互作用，进而促进产生轻重链错配产物。HZ14A9VH-CH1-IgG1 与 HZ5G11VL-Cβ，以及 HZ5G11VH-CH1-IgG1 和 HZ14A9VL-Cβ的共表达纯化后，相应的非还原 SDS-PAGE 的泳道上，未发现明显条带，即没有明显的杂合配对产物生成，表明 CH1 结构域与 MHCICβ之间无显著的相互作用。

为解决含 MHCICα重链和含 CL 结构域轻链发生错配的问题，对 MHCICα (SEQ ID NO：3)/MHCICβ (SEQ ID NO：4)以及 IgG1 恒定区 CH1(SEQ ID NO：34)/IgK 恒定区 CL(SEQ ID NO：35)的结构域接触界面进行结构分析，并结合序列分析，我们认为 CL 结构域中 114(EU 编号)、116(EU 编号)、118(EU 编号)位点可能涉及 MHCICβ和 CL 结构域在后续双特异性抗体装配中的互换过程，从而生成互换错配产物。为了验证 IgK 恒定区 CL 结构域中的 S114(EU 编号)、F116(EU 编号)、F118(EU 编号)单点突变对 MHCICα和 CL 结构域配对过程的影响，在轻链 HZ5G11VL-IgK 的 CL 结构域中 S114(EU 编号)、F116(EU 编号)或 F118(EU 编号)位点分别引入为非芳香族的疏水氨基酸（M：甲硫氨酸，A：丙氨酸，V：缬氨酸，I：异亮氨酸，或，L：亮氨酸），与重链 HZ14A9VH -Cα-IgG1 进行组合表达。部分构建的含突变的抗体轻链序列信息见表 10，部分不同重链/轻链配对表达组合见表 11。

表 10. 部分构建的含突变的抗体轻链序列信息

质粒	氨基酸序列	核苷酸序列
HZ5G11VL-IgK-S114A	SEQ ID NO：36	SEQ ID NO：37
HZ5G11VL-IgK-F116A	SEQ ID NO：38	SEQ ID NO：39
HZ5G11VL-IgK-F118A	SEQ ID NO：40	SEQ ID NO：41
HZ5G11VL-IgK-F118I	SEQ ID NO：42	SEQ ID NO：43

表 11. 部分不同重链/轻链配对表达组合

组合	轻链	重链
1	HZ5G11VL-IgK	HZ14A9VH-Cα-IgG1
2	HZ5G11VL-IgK-S114A	HZ14A9VH-Cα-IgG1
3	HZ5G11VL-IgK-F116A	HZ14A9VH-Cα-IgG1
4	HZ5G11VL-IgK-F118I	HZ14A9VH-Cα-IgG1
5	HZ5G11VL-IgK-F118A	HZ14A9VH-Cα-IgG1

就双特异性抗体开发方面而言，分子量>100kDa 的错配产物可能与目的产物无法有效分离或增加分离的难度，从而影响双特异性抗体产品的质量。结果显示 HZ5G11VL-IgK-F118A 与 HZ14A9VH-Cα-IgG1 配对组合能够显著降低分子量>100kDa 配对产物的生成（图 7），说明 F118A 单点突变能够降低 MHCICα和 CL 结构域之间的作用力，从而进一步解决或缓解 MHCICβ和 CL 结构域在后续双特异性抗体装配中的互换过程，从而提高双特异性抗体产品的质量。

实施例 5　CL 结构域中 F118A 突变对单克隆抗体组装的影响

为了验证 IgK 恒定区 CL 结构域中的 F118A(EU 编号)单点突变对单克隆抗体组装的影响，分别对靶向 CD47 和 PD-L1 的单克隆抗体（HZ14A9 和 HZ5G11）的轻链 IgK 恒定区进行 F118A 单点突变，将突变后的轻链分别与原来各自的重链进行配对表达，得到 HZ14A9-F118A 和 HZ5G11-F118A。同时分别表达野生型的靶向 CD47 和 PD-L1 的单克隆抗体（HZ14A9 和 HZ5G11）作为对照。抗体构建和表达方法参考实施例 4。

如图 11 所示，非还原 SDS-PAGE 实验结果表明所有检测样品的条带均位于 150 kDa 附近。表明 IgK 恒定区 CL 结构域中的 F118A(EU 编号)单点突变不影响单克隆抗体的组装。

实施例 6　anti-PDL1*CD47 双特异性抗体的构建及性能表征

5.1 构建和表达

为了验证 IgK 恒定区 CL 结构域中的 F118A(EU 编号)单点突变对双特异性抗体的影响，构建两种靶向 CD47 和 PD-L1 的双特异性抗体，其中，靶向 PD-L1 的抗原结合部分为 MHC-I 元件修饰的抗原结合部分，将抗体 HZ5G11 的 CH1/CL 替换为 MHCICα /MHCICβ，靶向 CD47 的抗原结合部分为 Fab，基于抗体 HZ14A9 构建，其中 Fab 轻链的恒定区 CL 结构域在 F118(EU 编号)位点不突变和携带 F118A 单点突变。所有抗体的两条重链的 CH2 结构域均采用 LALA（L234A+L235A）双突变以消除潜在的 Fc effector 效应，CH3 结构域携带 KIH 突变促使异二聚体的形成。从而产生两种同时靶向 CD47 和 PD-L1 双特异性抗体，分别为 MHL147-3322-IgG1-wt（分子结构参见图 8）和 MHL147-3322-IgG1-F118A（分子结构参见图 9）。

表 12. anti-PDL1*CD47 双特异性抗体的序列

抗体名称	多肽链	氨基酸序列
MHL147-3322-IgG1-wt	H2	（SEQ ID NO：49）
	L2	（SEQ ID NO：50）
	H3	（SEQ ID NO：51）
	L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSWYQQK PGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFIGSGSSTDFTLTISSLQPE DFATYYCGQSYSYPLTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （SEQ ID NO：53）
MHL147-3322-F118A	H2	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTVSGFSLSTYGVHWIRQPP GKALEWLGVIWRGVTTDYNAAFMSRLTITKDNSKNQVV LTMNNMDPVDTATYYCARLGFYAMDYWGQGTLVTVSS GKETLQRADPPKTHVTHHPISRHEATLRCWALGFYPAEIT LTWQRDGKDQTQKTELVETRPCGDRTFQKWAAVVVPSG EEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPS EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY

		PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：49）
	L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKP GKAPKLLIYYAANRYTGVPDRFSGSGYGTDFTFTISSLQPE DIATYFCQQDYTSPYTFGQGTKLEIK IQRTPKIQVYSCHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK NGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTRFTPTEKDEYACR VNHVTLSQPKIVKWDRGP （SEQ ID NO：50）
	H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIEDDYIEWVRQ APGQGLEWMGRIDPANDKTKYAQKFQGRVTMTGDTSTN TVYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLRRYYSMDYWGQGTL VTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK （SEQ ID NO：51）
	L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVSYVSWYQQK PGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFIGSGSSTDFTLTISSLQPE DFATYYCGQSYSYPLTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIAPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC （SEQ ID NO：52）

将编码组成各多肽链的DNA序列分别插入载体(例如CN107001463A披露的pcDNA3.1载体，CN109422811A披露的pCHO1.0载体，等)，获得表达相应多肽链的表达载体。将编码每种多肽链的表达载体各按照质量比等比例共转染ExpiCHO-S细胞（厂家：上海医药工业研究院，货号:127200005)，转染表达体积0.1~1L，细胞密度为6E+06 cells/ml的ExpiCHO-S（厂家：上海医药工业研究院，货号：127200005)。转染后将细胞置于ExpiCHO™培养基（厂家：Thermo，货号：A2910001)中，于32℃、5% CO_2、130 rpm条件下表达培养，第10天收取细胞上清液，使用来自GE的AKTA Pure 25 L系统和MabSelect SuRe LX填料对目标蛋白进行proteinA亲和层析。洗脱后，使用NanoDrop Lite（Thermo Fisher Scientific）测量洗脱收获的蛋白浓度，SEC-HPLC检测洗脱的蛋白纯度。

表12. Anti-PDL1*CD47双特异性抗体的表达量和纯度

样品	纯化方式	表达量(mg/L)	HPLC-SEC纯度(%)
MHL147-3322-IgG1-wt	protein A亲和色谱	22	82.94
MHL147-3322-IgG1-F118A	protein A亲和色谱	38	92.85

一步protein A亲和色谱纯化结果显示MHL147-3322-IgG1-F118A比MHL147-3322-IgG1-wt具有更高的表达产量和纯度（表12)，CL结构域中的F118A(EU编号)单点突变能够改善双特异性抗体在细胞内的组装配对过程，减少错配产物的形成，从而

提高了双特异性抗体的表达量和纯度。

5.2 热稳定性

通过 Nano DSF（Nano Temper）表征 HZ14A9、HZ5G11、MHL147-3322-IgG1-wt 和 MHL147-3322-IgG1-F118A 热稳定性质。将待测样品的浓度调整至 1.0 mg/ml 左右，然后用石英毛细管分别吸取少量样品，置于 Nano DSF 样品悬架之中，以恒定速率 1.0℃/min 在 20.0℃-95.0℃区间程序升温，收集蛋白质样品的光学信号变化，分析蛋白热稳定性。

表 13. Anti-PDL1*CD47 双特异性抗体的热稳定性

样品	熔解温度 Tm1(℃)
MHL147-3322-IgG1-wt	66.4
MHL147-3322-IgG1-F118A	67
HZ14A9	68.3
HZ5G11	67

Nano DSF 实验结果显示 HZ14A9 、 HZ5G11 、 MHL147-3322-IgG1-wt 和 MHL147-3322-IgG1-F118A 都具有良好的热稳定性，所有样品的熔解温度 Tm1 均高于 65℃（表 13）。CL 结构域中的 F118A(EU 编号)单点突变对双特异性抗体的热稳定性无显著影响。

5.3 亲和力

通过 Biacore 表征 HZ5G11 单抗、HZ14A9 单抗、MHL147-3322-IgG1-wt 和 MHL147-3322-IgG1-F118A 双抗亲和力性质。通过捕获法分别将 HZ5G11 单抗、HZ14A9 单抗、MHL147-3322-IgG1-wt 和 MHL147-3322-IgG1-F118A 双抗固定到传感芯片上，进样一定浓度梯度的人类 PDL1(厂家：百普赛斯，货号：PD1-H52H3)或人类 CD47(厂家：百普赛斯，货号：CD7-H5227)蛋白抗原溶液，Biacore 8K Control Software 3.0 实时采集结合解离曲线，并通过 Biacore Insight Evaluation Software 3.0 进行数据分析，得出结合速率常数 Ka、解离速率常数 Kd 和平衡常数 KD。

表 14. Anti-PDL1*CD47 双特异性抗体对人 CD47 抗原的结合亲和力

样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
HZ14A9 单抗	2.45E+06	1.43E-02	5.85E-09
MHL147-3322-IgG1-F118A	4.74E+06	2.49E-02	5.26E-09
MHL147-3322-IgG1-wt	3.75E+06	1.24E-02	3.31E-09

表 15. Anti-PDL1*CD47 双特异性抗体对人 PDL1 抗原的结合亲和力

样品	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
HZ5G11 单抗	1.51E+06	4.27E-04	2.82E-10
MHL147-3322-IgG1-F118A	1.58E+06	6.06E-04	3.84E-10
MHL147-3322-IgG1-wt	1.85E+06	5.62E-04	3.04E-10

实验结果表明，双特异性抗体 MHL147-3322-IgG1-wt 和 MHL147-3322-IgG1-F118A 都对人的 PDL1 和 CD47 蛋白表现出良好的亲和力（表 15、表 16）。

5.4 红细胞凝集实验

通过人红细胞凝集实验表征 MHL147-3322-IgG1-wt 和 MHL147-3322-IgG1-F118A 潜在血液安全性质。将红细胞充分清洗，以除去附着在红细胞膜表面的血浆。使用等渗的稀释液将红细胞洗涤 3 次，前 2 次 2000 rpm/min 离心 5 min；末次 2000 rpm/min 离心 10 min，弃上清。使用 PBS 将红细胞制成 2%细胞悬液，吸取 100 μL 放入 96 孔 U 型板中，1500 rpm/min 离心 5min，弃上清。将 MHL147-3322-IgG1-wt、MHL147-3322-IgG1-F118A 以及同型对照 hIgG1 样品调整为 8 个浓度梯度（0，0.1，0.2，0.7，2，6，17，50 μg/ml），96 孔 U 型板加入抗体稀释液，反应总体积为 100 μL，重悬混匀后于 37℃培养箱静置 2 h，孵育 2h 后观察结果。如图 10 所示，双特异性抗体浓度在≥2 μg/ml 的条件下，相对于 MHL147-3322-IgG1-wt，MHL147-3322-IgG1-F118A 表现出更弱的红细胞凝集能力，从而提示 IgK 恒定区 CL 结构域中的 F118A(EU 编号)突变能够有效地减少错配产物的形成，提高双特异性抗体的均一性。

权 利 要 求 书

1. 一种双特异性抗体，其包含第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分和第二抗原结合部分特异性结合两种不同抗原或同一种抗原的不同表位，其中所述第一抗原结合部分包含：

第一多肽，所述第一多肽自 N 端至 C 端包含第一重链可变结构域以及与所述第一重链可变结构域可操作连接的第一配对结构域，和

第二多肽，所述第二多肽自 N 端至 C 端包含第一轻链可变结构域以及与所述第一轻链可变结构域可操作连接的第二配对结构域，

其中，所述第一配对结构域和第二配对结构域中的一个配对结构域包含工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列，另一个配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其中所述第一配对结构域和第二配对结构域能够形成二聚体，所述第一配对结构域和第二配对结构域之间能够形成至少一个非天然链间键且所述非天然链间键能够稳定所述二聚体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的双特异性抗体，其中所述第一配对结构域包含工程化的 HLA-Iα3 的氨基酸序列，所述第二配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列；或，

所述第一配对结构域包含工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列，所述第二配对结构域包含工程化的 HLA-Iα3 的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述工程化的 HLA-I α3 的氨基酸序列与 SEQ ID NO：1 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性，所述工程化的 β2 微球蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO：2 所示序列具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的同一性。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述工程化的 HLA-I α3 包含在 SEQ ID NO：1 具有氨基酸取代的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含在 SEQ ID NO：2 具有氨基酸取代的氨基酸序列。

6. 根据权利要求 5 所述的双特异性抗体，其中工程化的 HLA-I α3 和工程化的 β2 微球蛋白中的所述氨基酸取代均包含发生在两者接触界面且能够彼此形成二硫键的半胱氨酸残基取代；

所述半胱氨酸残基取代选自下组中的一对至多对：

（1）SEQ ID NO：1 中的 R60C 和 SEQ ID NO：2 中的 Y26C；

（2）SEQ ID NO：1 中的 A62C 和 SEQ ID NO：2 中的 R12C；

（3）SEQ ID NO：1 中的 G63C 和 SEQ ID NO：2 中的 Y67C。

7. 根据权利要求 5-6 中任一项所述的双特异性抗体，其中工程化的 HLA-I α3 或/和工程化的 β2 微球蛋白中的氨基酸取代包含提高配对结构域形成的二聚体或双特异性抗体的等电点的氨基酸取代；

其中提高等电点的氨基酸取代包含：工程化的 HLA-I α3 在 SEQ ID NO：1 序列的 E3、D22、E48、D53、E90、E101 中的一个或几个位置被正电氨基酸取代或/和

提高等电点的氨基酸取代包含：工程化的 β2 微球蛋白中在 SEQ ID NO：2 序列的 E74、E47、E69、D34、E16、D53、E44、E50、E36 中的一个或几个位置被正电氨基酸取代；优选的，

提高等电点的氨基酸取代包含：所述工程化的 HLA-I α3 在 SEQ ID NO：1 序列包含氨基酸取代 D22R、E48K 和 D53K，并且所述工程化的 β2 微球蛋白在 SEQ ID NO：2 序列包含氨基酸取代 E69R。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：4 的氨基酸序列；或，

所述工程化的 HLA-I α3 包含 SEQ ID NO：3 的氨基酸序列，所述工程化的 β2 微球蛋白包含 SEQ ID NO：5 的氨基酸序列。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合部分包含 Fab；优选的，

根据 EU 编号，所述 Fab 的 CL 结构域在 F118 位置的氨基酸被丙氨酸取代。

10. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的双特异性抗体，所述双特异性抗体为二价的。

11. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的双特异性抗体，其还包含第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分与第二抗原结合部分结合相同的抗原表位；或，

所述第三抗原结合部分与第一抗原结合部分结合相同的抗原表位。

12. 根据权利要求 10 所述的双特异性抗体，所述双特异性抗体为三价的。

13. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的双特异性抗体，其进一步包含能够稳定缔合的两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。

14. 根据权利要求 13 所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接；或，

所述第一抗原结合部分的第一多肽在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分包含 Fab，其 Fab 重链在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。

15. 根据权利要求 11-12 中任一项所述的双特异性抗体，其进一步包含能够稳定缔合的两个 Fc 多肽构成的 Fc 域。

16. 根据权利要求 15 所述的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第三抗原结合部分在其 C 端与第一抗原结合部分的 N 端或第二抗原结合部分的 N 端可操作性的连接；或，

所述第三抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第一抗原结合部分在其 C 端与所述第三抗原结合部分的 N 端可操作性的连接，第二抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接；或，

所述第三抗原结合部分在其 C 端与其中一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接，所述第二抗原结合部分在其 C 端与所述第三抗原结合部分的 N 端可操作性的连接，第一抗原结合部分在其 C 端与另一个 Fc 多肽的 N 端可操作性的连接。

17. 一种在有需要的受试者中治疗疾病的方法，包括向受试者施用治疗有效量的根据权利要求 1-16 中任一项所述的双特异性抗体；优选，所述疾病包括白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、卵巢癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌、支气管癌、骨癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、肝细胞癌、胆囊癌、胆管癌、食道癌、肾细胞癌、甲状腺癌、头颈癌、睾丸癌、内分泌腺癌、肾上腺癌、脑下垂体癌、皮肤癌、软组织癌、血管癌、脑癌、神经癌、眼癌、脑膜癌、口咽癌、下咽部癌、宫颈癌、子宫癌、成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、星形细胞瘤、胶质瘤、脑膜瘤、胃泌素瘤、成神经细胞瘤、黑色素瘤、骨髓增生异常综合征或肉瘤。

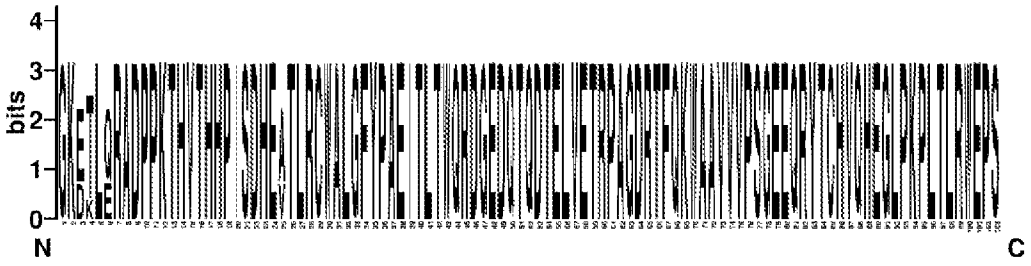
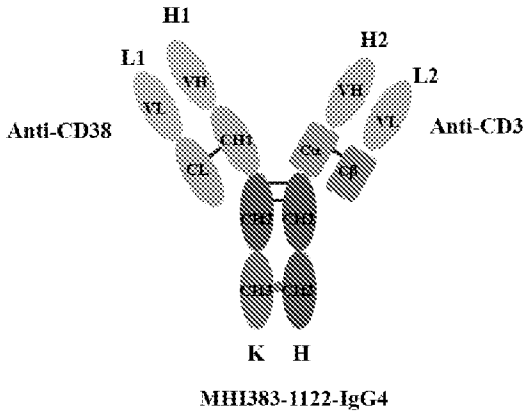
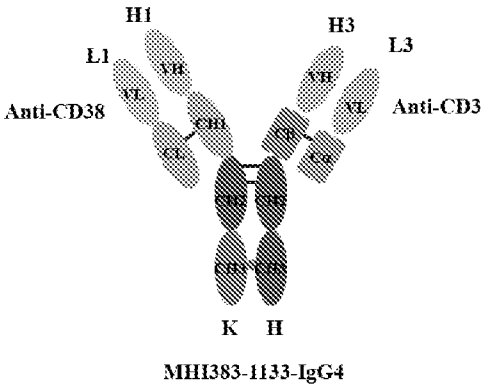


图 1

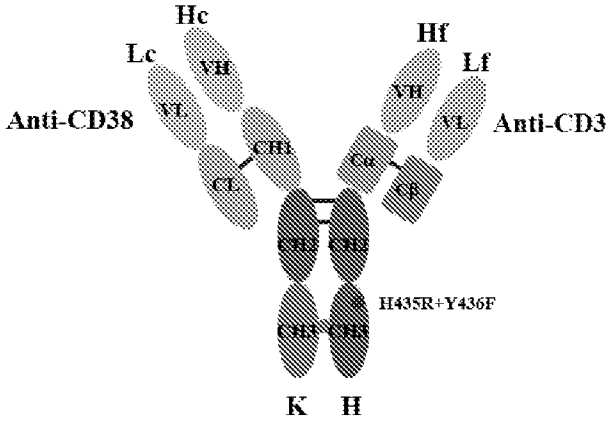


MHI383-1122-IgG4



MHI383-1133-IgG4

图 2



MHI383-ccff-IgG1 (Fc silence)

图 3

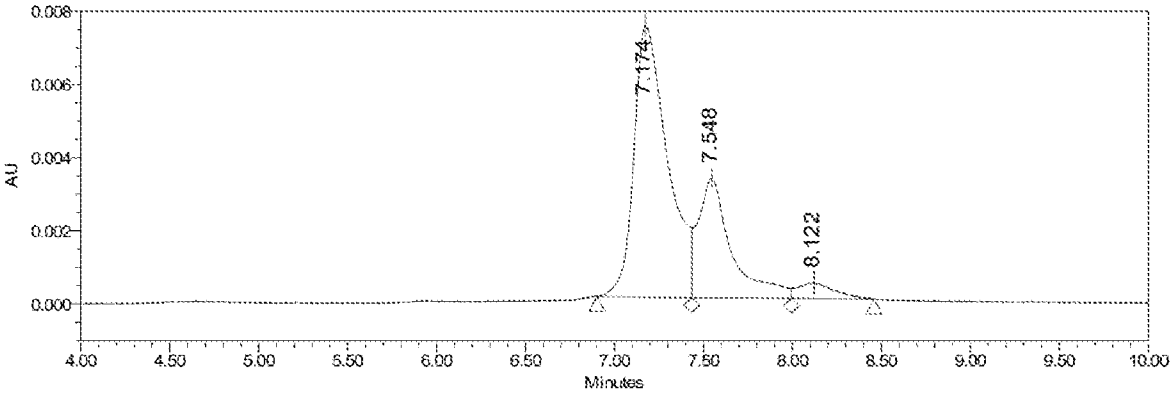


图 4

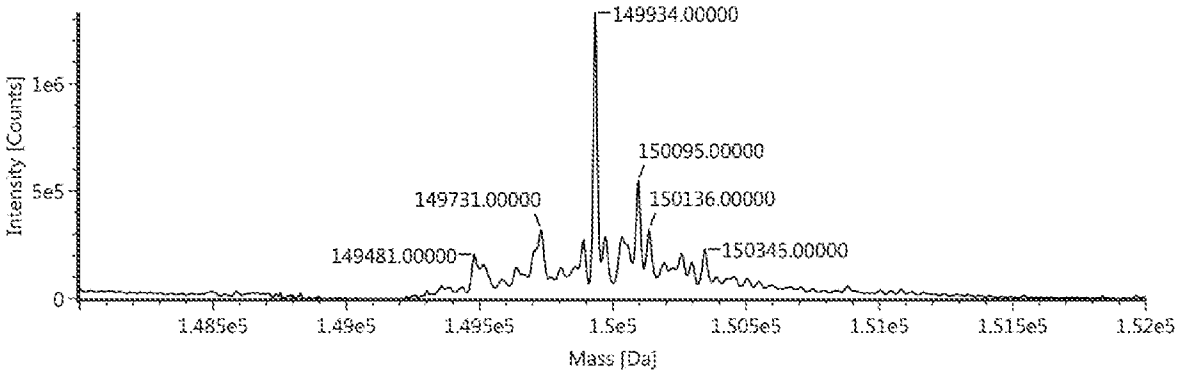
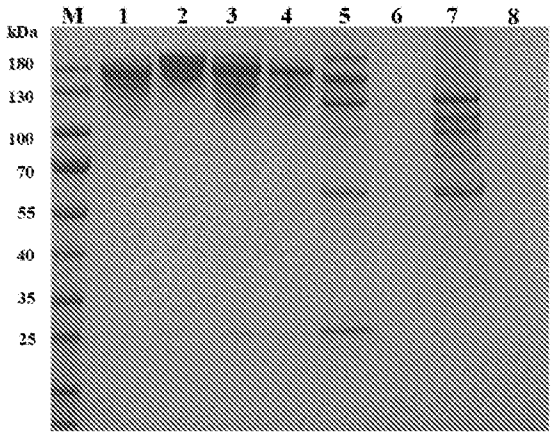
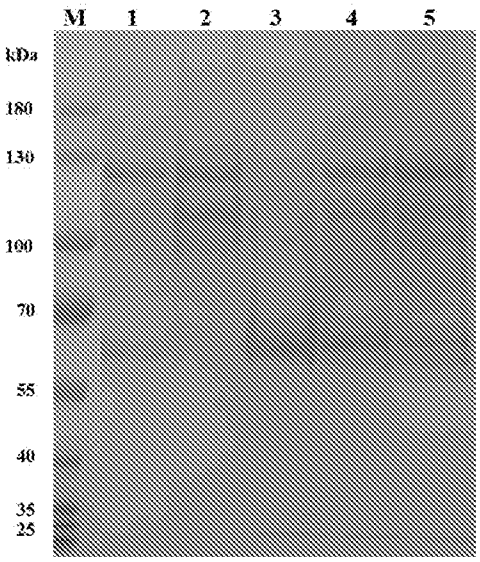


图 5



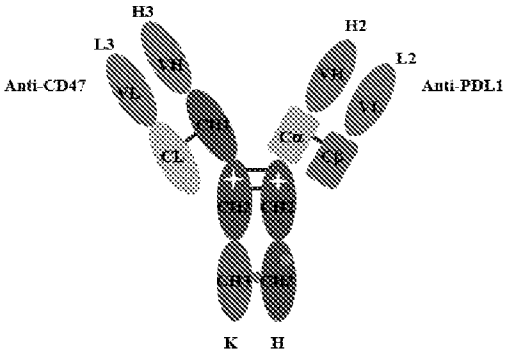
通道M: marker
通道1: HZ5G11VH-CH1-IgG1+HZ5G11VL-IgK
通道2: HZ14A9VH-CH1-IgG1+HZ14A9VL-IgK
通道3: HZ5G11VH-CH1-IgG1+HZ14A9VL-IgK
通道4: HZ14A9VH-CH1-IgG1+HZ5G11VL-IgK
通道5: HZ5G11VH-Cα-IgG1+HZ14A9VL-IgK
通道6: HZ14A9VH-CH1-IgG1+HZ5G11VL-Cβ
通道7: HZ14A9VH-Cα-IgG1+HZ5G11VL-IgK
通道8: HZ5G11VH-CH1-IgG1+HZ14A9VL-Cβ

图 6



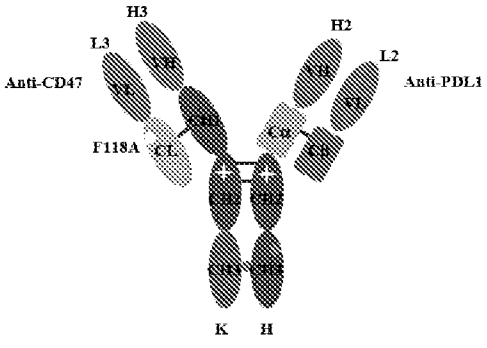
通道M: marker
通道1: HZ14A9VH-Cα-IgG1+HZ5G11VL-IgK
通道2: HZ14A9VH-Cα-IgG1+HZ5G11VL-IgK-F118I
通道3: HZ14A9VH-Cα-IgG1+HZ5G11VL-IgK-F118A
通道4: HZ14A9VH-Cα-IgG1+HZ5G11VL-IgK-F116A
通道5: HZ14A9VH-Cα-IgG1+HZ5G11VL-IgK-S114A

图 7



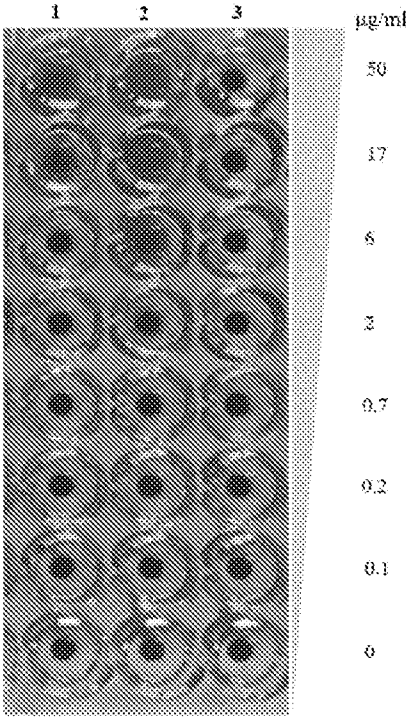
MHL147-3322-IgG1-wt

图 8



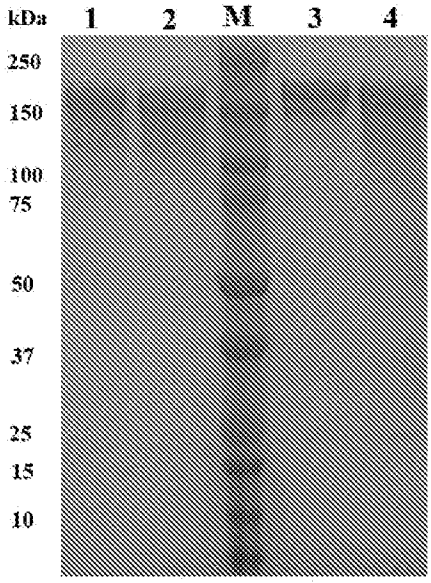
MHL147-3322-IgG1-F118A

图 9



通道1: MHL147-332 2-IgG1-F118A
通道2: MHL147-332 2-IgG1-wt
通道3: hIgG1

图 10



通道M: marker
通道1：HZ5G11-F118A
通道2：HZ5G11
通道3：HZ14A9
通道4：HZ14A9-F118A

图 11

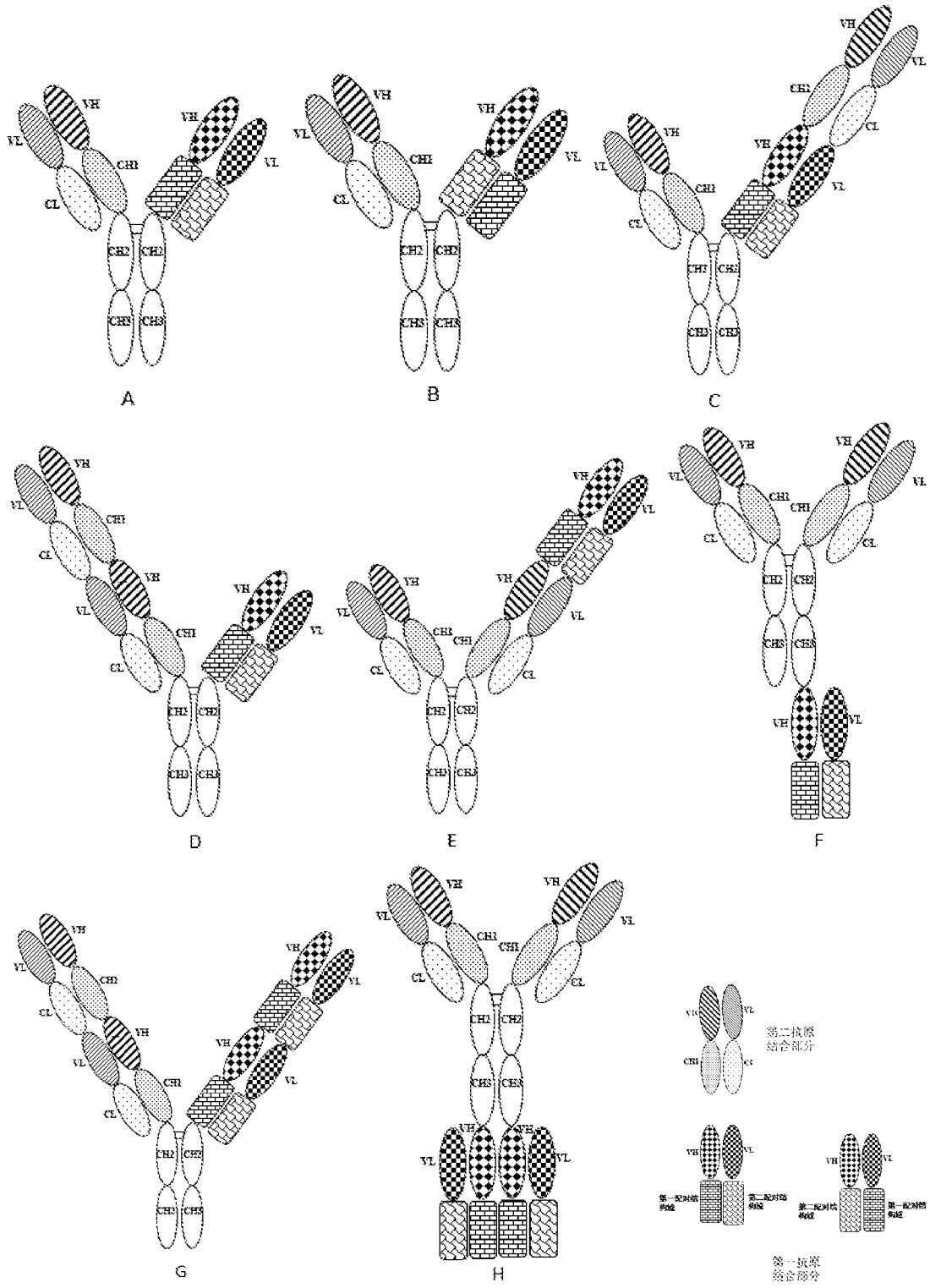


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/074133

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/00(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C07K 14/74(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, VEN, CNKI, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, pubmed, ISI web of science, STN, 中国生物序列检索系统, Chinese Biological Sequence Retrieval System: 正大天晴, 王亮亮, bispecific, multispecific , antibody+, 双特异性, 多特异性, 抗体, SEQ ID NO: 1-5, HLA,α3,β2-微球蛋白, microglobulin, 配对, 异二聚体, 异源二聚体, heterodimerizing, 二硫键, disulfide, R60, A62, G63, A62C, R12C, 等电点, D22R, E48K, D53K, E69R, 空间位阻, steric hindrance, Cβ区, 构象稳定, Conformational stabilization, 羧基端, GP, 融合, 结构域, B2M, β2M, ch1, cl, MHC-Ia3, hla-1a3, hla-ba3, 构建, 取代, 替代, 置换, substitut+, 错配, mismatch

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018237192 A1 (GSBIO, LLC.) 27 December 2018 (2018-12-27) claims 1, 5, and 6, figures 1-2, sequence table SEQ ID NO: 8 and 12, and description, paragraphs 53-60	1-4 (in part), 10, 13 (in part)
Y	WO 2018237192 A1 (GSBIO, LLC.) 27 December 2018 (2018-12-27) claims 1, 5, and 6, figures 1-2, sequence table SEQ ID NO: 8 and 12, and description, paragraphs 53-60	5-9, 11-12, 14-16, 10, 13, 17 (in part)
Y	CN 104884474 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE LTD.) 02 September 2015 (2015-09-02) description, paragraph 371, and figure 21	5-9, 11-12, 14-16, 10, 13, 17 (in part)
A	WO 2019179627 A1 (UNIVERSITY OF STUTTGART) 26 September 2019 (2019-09-26) entire document	1-17
A	CN 111094333 A (UNIVERSITY OF STUTTGART) 01 May 2020 (2020-05-01) entire document	1-17

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 April 2022	**28 April 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005087810 A2 (ZYMOGENETICS, INC.) 22 September 2005 (2005-09-22) entire document	1-17
A	CN 109414498 A (CUE BIOPHARMA INC) 01 March 2019 (2019-03-01) entire document pp. 2566-2572	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/074133

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/074133

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 17 relates to a method for treating diseases in a subject, which belongs to a disease treatment defined in PCT Rule 39.1(iv), and therefore, a search is conducted on the basis of a corresponding pharmaceutical use of the product of claim 17.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/074133

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018237192	A1	27 December 2018	EP	3642228	A1	29 April 2020
				CA	3068270	A1	27 December 2018
				AU	2018290272	A1	30 January 2020
CN	104884474	A	02 September 2015	WO	2014096015	A1	26 June 2014
				ES	2700984	T3	20 February 2019
				HK	1214276	A1	22 July 2016
				IL	238499	D0	30 June 2015
				CA	2889788	A1	26 June 2014
				RU	2015129640	A	26 January 2017
				AR	094149	A1	15 July 2015
				MX	2015007239	A	12 August 2015
				AU	2013360775	A1	14 May 2015
				US	2015344586	A1	03 December 2015
				KR	20150097688	A	26 August 2015
				JP	2016501900	A	21 January 2016
				PL	2935328	T3	28 February 2019
				SG	11201504414U	A	30 July 2015
				EP	2935328	A1	28 October 2015
WO	2019179627	A1	26 September 2019	AU	2018414456	A1	15 October 2020
				US	2021002376	A1	07 January 2021
				CA	3093481	A1	26 September 2019
				EP	3768705	A1	27 January 2021
WO	2005087810	A2	22 September 2005	AT	517914	T	15 August 2011
				US	2005260716	A1	24 November 2005
				EP	1732946	A2	20 December 2006
				US	2009075338	A1	19 March 2009
				CA	2558811	A1	22 September 2005

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/074133

A. 主题的分类

C07K 16/00(2006.01)i；C07K 16/46(2006.01)i；C07K 14/74(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS,CNTXT,WOTXT,USTXT,JPTXT,KRTXT,VEN,CNKI，百度学术，pubmed，ISI web of science，STN，中国生物序列检索系统：正大天晴，王亮亮，bispecific， multispecific ，antibody+，双特异性，多特异性，抗体，SEQ ID NO: 1-5，HLA,α3,β2-微球蛋白， microglobulin，配对，异二聚体，异源二聚体，heterodimerizing，二硫键，disulfide，R60,A62,G63， A62C， R12C,等电点，D22R,E48K，D53K，E69R，空间位阻，steric hindrance，Cβ区，构象稳定，Conformational stabilization，羧基端，GP，融合，结构域,B2M， β2M,ch1,cl,MHC-Ia3,hla-1a3,hla-ba3,构建，取代，替代，置换，substitut+，错配，mismatch

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2018237192 A1 (GSBIO， LLC.) 2018年12月27日 (2018-12-27) 权利要求1和5-6，说明书附图1-2，序列表SEQ ID NO:8和12，说明书第53-60段	1-4以及10和13（部分）
Y	WO 2018237192 A1 (GSBIO， LLC.) 2018年12月27日 (2018-12-27) 权利要求1和5-6，说明书附图1-2，序列表SEQ ID NO:8和12，说明书第53-60段	5-9、11-12、14-16以及10、13和17（部分）
Y	CN 104884474 A (弗 哈夫曼-拉罗切有限公司) 2015年9月2日 (2015-09-02) 说明书第371段及附图21	5-9、11-12、14-16以及10、13和17（部分）
A	WO 2019179627 A1 (UNIVERSITÄT STUTTGART) 2019年9月26日 (2019-09-26) 全文	1-17
A	CN 111094333 A (斯图加特大学) 2020年5月1日 (2020-05-01) 全文	1-17

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年4月8日	2022年4月28日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 孙谦 电话号码 86-(10)-53962101

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/074133

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2005087810 A2 (ZYMOGENETICS, INC.) 2005年9月22日 (2005-09-22) 全文	1-17
A	CN 109414498 A (CUE生物制药公司) 2019年3月1日 (2019-03-01) 全文 第2566-2572页	1-17

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/074133

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/074133

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☑ 权利要求： 17
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求17涉及治疗受试者疾病的方法，属于PCT细则39.1（iv）规定的疾病的治疗方法，因此基于权利要求17产品相应的制药用途进行检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/074133

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2018237192	A1	2018年12月27日	EP	3642228	A1	2020年4月29日
				CA	3068270	A1	2018年12月27日
				AU	2018290272	A1	2020年1月30日
CN	104884474	A	2015年9月2日	WO	2014096015	A1	2014年6月26日
				ES	2700984	T3	2019年2月20日
				HK	1214276	A1	2016年7月22日
				IL	238499	D0	2015年6月30日
				CA	2889788	A1	2014年6月26日
				RU	2015129640	A	2017年1月26日
				AR	094149	A1	2015年7月15日
				MX	2015007239	A	2015年8月12日
				AU	2013360775	A1	2015年5月14日
				US	2015344586	A1	2015年12月3日
				KR	20150097688	A	2015年8月26日
				JP	2016501900	A	2016年1月21日
				PL	2935328	T3	2019年2月28日
				SG	11201504414U	A	2015年7月30日
				EP	2935328	A1	2015年10月28日
WO	2019179627	A1	2019年9月26日	AU	2018414456	A1	2020年10月15日
				US	2021002376	A1	2021年1月7日
				CA	3093481	A1	2019年9月26日
				EP	3768705	A1	2021年1月27日
WO	2005087810	A2	2005年9月22日	AT	517914	T	2011年8月15日
				US	2005260716	A1	2005年11月24日
				EP	1732946	A2	2006年12月20日
				US	2009075338	A1	2009年3月19日
				CA	2558811	A1	2005年9月22日